

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Marburg

ZUR CHEMISCHEN REAKTIVITÄT VON
N-METHYL-N- β -CHLORÄTHYLHYDRAZIN UND EINIGEN
HYDRAZONDERIVATEN SOWIE IHREM
METABOLISMUS IN VITRO UND IN VIVO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

NIKOLAUS WEBER
aus Grevenbrück

Marburg/Lahn 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Marburg

ZUR CHEMISCHEN REAKTIVITÄT VON
N-METHYL-N- β -CHLORÄTHYLHYDRAZIN UND EINIGEN
HYDRAZONDERIVATEN SOWIE IHREM
METABOLISMUS IN VITRO UND IN VIVO

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Humanbiologie

eingereicht dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

NIKOLAUS WEBER

aus Grevenbrück

Marburg/Lahn 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am: 20. 12. 1976

Dekan: Prof. Dr. med. Neurath

Referent: Prof. Dr. med. K. J. Netter

Correferent: Dr. R. Braun

Diese Arbeit wurde zwei Jahre durch ein Graduierten-
stipendium gefördert.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552328_0074

Meinen Eltern und meiner Frau Gisela gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	4
I. Material	4
II. Methoden	8
1. Zur Analytik von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin (A_1)	8
1.1. Bestimmung der β -Chloräthylgruppe	8
1.1.1. Reaktion mit 4-Pyridincarboxaldehyd-2-benzothiazolyldiazon (PBH)	8
1.1.2. Reaktion mit 4-(4-Nitrobenzylpyridin) (NBP)	9
1.2. Bestimmung der NH_2 -Gruppe	11
1.2.1. Reaktion mit 7-Chlor-4-nitrobenzofurazon (NBD-Cl)	11
1.2.2. Reaktion mit 4-Nitrobenzaldehyd	11
1.3. Bestimmung der N-Methylgruppe	12
2. Formaldehydbestimmung nach der Chromotrop-säuremethode	14
3. Aldehydbestimmung mit 2-Hydrazono-2,3-dihydro-3-methylbenzothiazol (HMBT)	14
4. Formaldehydbildung unter dem Einfluß von Kaliumhexacyanoferrat-(III)	15
5. Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na durch Hydrazinderivate	16
6. Beeinflussung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Aktivität durch Methylhydrazinderivate	16
7. Zum Vergleich der Alkylierung von NBP und NBP-Perchlorat durch N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinderivate	17

8. Bestimmung der Bildung einer Aziridiniumstruktur	17
9. Adsorptive Bindung der Subst. A ₁ an die Hefezellwand	18
10. Bilanz-Versuch	18
11. Mikrosomenpräparation und Aufbereitung	19
12. Registrierung der Bindungsspektren	22
13. N-Demethylierung durch Lebermikrosomen in vitro	22
14. Formaldehydbestimmung nach Nash	24
15. Bestimmung des 4-Nitrophenols	24
16. Bestimmung des p-Aminophenols	25
17. Hemmung der mikrosomalen N-Demethylierung von N-Methylhydrazinderivaten durch SKF 525-A, Metyrapon, CO- und Na-Desoxycholat	25
18. Gewinnung der Mikrosomenfraktion aus Ehrlich-Ascitescarzinomzellen	26
19. Bestimmung der Hexobarbital-Schlafzeit	27
 C. Ergebnisse	 28
 I. Untersuchungen zur chemischen Reaktivität in vitro	 28
1. Alkylierungsvermögen	28
1.1. Vergleichende Versuche mit NBP und NBP-Perchlorat	29
1.2. Bestimmung der Bildung des Aziridinium-ions	31
1.3. Hemmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase durch die Substanzen A ₁ , B ₁₋₃ und C	34
2. Redoxverhalten	36
2.1. Untersuchung zur Redoxwirkung verschiedener Hydrazinderivate	36

2.2. Aldehydbildung aus Subst. A ₁	38
2.3. Formaldehydbildung aus den Substanzen A ₁ , B ₁ und C unter milder Dehydrierung mit Kaliumhexacyanoferrat-(III)	39
II. Untersuchung zur mikrosomalen N-Demethylierung	40
1. Versuche zur Standardisierung des mikrosomalen Systems in vitro	42
2. Kinetik der mikrosomalen N-Demethylierung	47
3. Bindungsspektren	51
4. Mikrosomale N-Demethylierung nach Induktion mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren	53
5. Hemmung der mikrosomalen N-Demethylierung durch SKF 525-A, Metyrapon, CO und Na-Desoxycholat	59
6. Beeinflussung der mikrosomalen N-Demethylierung durch Thioglykolsäure	63
III. Untersuchungen zur Leberaktivität nach Applikation von Subst. B ₁ in vivo	66
1. Einfluß der mischfunktionellen Oxidaseaktivität auf den Umsatz von Anilin, p-Nitroanisol, Subst. B ₁ und Aminopyrin nach Gabe von Subst. B ₁	66
2. Beeinflussung der Hexobarbital-Schlafzeit durch Subst. B ₁	72
IV. Metabolische Mikrosomenaktivität der Meerschweinchenleber	76
V. Metabolische Mikrosomenaktivität der Ehrlich-Ascitescarzinomzellen der Maus	77
VI. Adsorptive Bindung der Subst. A ₁ an die Hefezellwand	78
VII. Umsatz der Subst. A ₁ im Wachstumsversuch mit unsynchronisierten Hefezellen	80

	Seite
D. Diskussion	84
E. Zusammenfassung	89
F. Literaturverzeichnis	91

A. E I N L E I T U N G

=====

Hydrazin und seine Derivate waren lange Zeit nur von technischer Bedeutung und weckten für die Medizin allenfalls toxi-kologisches Interesse. Nach dem Zweiten Weltkrieg fand man jedoch Hydrazinabkömmlinge, die bis heute in unserem Arznei-mittelschatz einen festen Platz einnehmen und mit Erfolg ein-gesetzt werden. So zeigen Hydrazone und Semicarbazide des 5-Nitrofurals (MIURA u. RECKENDORF) in der Chemotherapie ein breites Wirkungsspektrum. Weiter sind Isonikotinsäurehydrazid (INH) (DOMAGK et al., 1952) und seine Hydrazone (FOX u. GIBAS, 1953) Tuberculostatika erster Wahl. Bei dem INH-Derivat Iproniazid (ISLER et al., 1955) wurde neben der tuberkulostatischen auch eine hemmende Wirkung auf die Monoaminoxidase festgestellt, was zur Entwicklung zahlreicher MAO-Hemmer führte (PLETSCHER u. ZELLER, 1960), die heute allerdings keine größere klinische Bedeutung mehr besitzen. Hydralazine (DRUEY u. RINGER, 1951) finden wegen ihrer starken Wirkung auf die Gefäßmuskulatur als Antihypertonika Verwendung, werden aber auf Grund ihrer star-ken Nebenwirkungen nur in Mischpräparaten mit anderen Anti-hypertensiva verwendet.

Etwa ab 1960 rückte dann auch die cytotoxische Wirksamkeit von Hydrazinverbindungen in den Vordergrund. So beeinflussen Hydrazin und seine Alkylderivate das Wachstum von Bäckerhefe und Ehrlich-Asciteszellen (E.R.Z.) in vitro (MÜLLER, 1960). Aber auch in vivo konnte eine hemmende Wirkung von Hydrazin und Methylhydrazin auf das Wachstum des Ehrlich-Ascites-

carzinoms der Maus nachgewiesen werden (WEITZEL et al., 1967). Vor allem Methylhydrazine besitzen nach ZELLER et al., 1963, sowie BOLLAG u. GRUNBERG, 1963, eine ausgeprägte cytostatische Wirksamkeit. Von den untersuchten Verbindungen dieser Gruppe hat sich in der Therapie jedoch bisher nur das Procarbazin (4-(2-Methylhydrazinomethyl)-N-isopropylbenzamid) vor allem bei der Lymphogranulomatose bewährt. Eingehende Untersuchungen über den Wirkmechanismus des Procarbazins deuten darauf hin, daß der cytostatische Effekt einmal auf der Bildung von Wasserstoffperoxid beruht, das zur Fragmentierung von DNA führt (BERENEIS et al., 1962 und WEITZEL et al., 1963), und es zum anderen zu Methylierungsreaktionen am genetischen Material kommt (KREIS u. YEN, 1964, und KREIS et al., 1966). Procarbazin reduziert den Mitoseindex und bewirkt Chromatidbrüche (HUANG et al., 1968). Sicher ist, daß der Monomethylhydrazingruppierung eine zentrale Rolle zukommt, da das "Nor-Procarbazin" nahezu wirkungslos ist (BOLLAG u. GRUNBERG, 1963). Auf Grund seiner methylierenden Eigenschaft kann das Procarbazin zu den alkylierenden Cytostatika gezählt werden, deren typische Vertreter jedoch aus der Reihe der Stickstofflostverbindungen stammen und bifunktionelle Alkylantien darstellen.

So kann das von BOHME und MARTIN, 1974, neu beschriebene N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin (Subst. A₁) als strukturelles Bindeglied zwischen den Stickstofflostabkömmlingen und den Methylhydrazinen betrachtet werden. Diese neue Verbindung sowie auch sein Benzaldehydhydrazon (Subst. B₁) sind einerseits Methylhydrazine, tragen aber andererseits auch eine β -Chloräthylgruppe. Wie vorangegangene Untersuchungen gezeigt haben, verfügen diese Substanzen ebenfalls über cytostatische Aktivitäten (BRAUN u. WOLF, 1976 und BRAUN et al., 1976).

Weiterhin vermögen sie Wachstum und Vermehrung von Hefezellen (*Sacch. cerevisiae*) zu hemmen (BRAUN et al., 1976, und BRAUN u. LANGE, 1976).

Da es sich bei den Substanzen A₁ und B₁ um Vertreter neuer chemischer Substanzklassen handelt, war es von Interesse, etwas über ihr chemisches Verhalten in physiologischer Umgebung zu erfahren. Hierzu mußten zunächst analytische Methoden erarbeitet werden, mit deren Hilfe autoxidative Abbauvorgänge erfaßt werden können. Wie Untersuchungen von BRAUN und HEFTER, 1976, ergaben, ist auch bei der Substanz B₁ die N-Methylgruppe von essentieller Bedeutung. Es war daher die oxidative N-Demethylierung bei den Substanzen A₁ und B₁ sowie einigen Hydrazonanalogen durch Rattenlebermikrosomen in vitro zu bestimmen. Weiterhin sollte der Einfluß dieser neuen Cytostatika auf die Funktion der mischfunktionellen Oxidasen der Leber in vivo studiert werden. Bei diesen Untersuchungen wurde Procarbazin (Substanz C) als Vergleichssubstanz herangezogen.

B. MATERIAL UND METHODEN

=====

I. Material

a) Chemikalien:

SKF 525-A (Proadifen)	Fa. Röhm Pharma, Darmstadt
Metyrapon	Fa. Ciba Geigy, Basel
3-Methylcholanthren (3 MC)	Fa. Serva, Heidelberg
2-Hydrazino-benzo- thiazol	Fa. Serva, Heidelberg
Na-Hexobarbital	Fa. Bayer, Leverkusen
Rinderalbumin	Fa. Behringwerke, Marburg
4-(4-Nitrobenzyl- pyridin)	Fa. Riedel-De Hæn, Hannover
Trihexylamin	Fa. Fluka, Neu-Ulm
Biotin	Fa. Hoffman-La Roche, Basel
N-Dimethyl-N-ß-chlor- äthylamin HCl	Fa. Hoechst, Frankfurt

Die verwendeten Enzyme und Substrate wurden von der Firma Boehringer (Mannheim) bezogen.

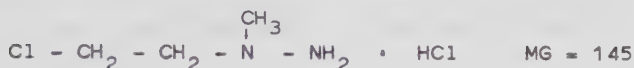
Alle weiteren nicht einzeln aufgeführten Chemikalien stammen in p.A.-Qualität von der Fa. Merck, Darmstadt.

b) Kohlenmonoxid-Gas

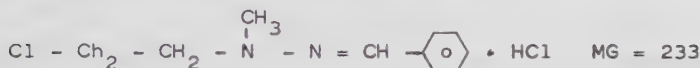
Kohlenmonoxid wurde nach der herkömmlichen Methode aus Ameisensäure und Schwefelsäure dargestellt. Die Reinigung des Gases erfolgte durch Einleiten in Waschflaschen mit Kalilauge und Wasser.

c) Testsubstanzen

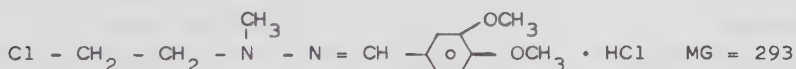
N-Methyl-N'-β-chloräthylhydrazin-HCl (Subst. A₁)



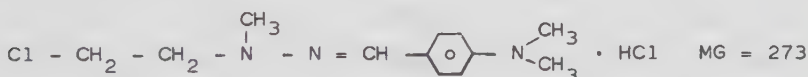
N'-Methyl-N'-β-chloräthylbenzaldehydhydrazon-HCl (Subst. B₁)



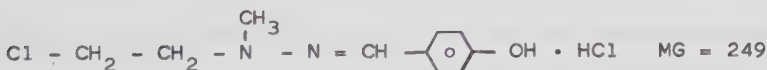
N'-Methyl-N'-β-chloräthyl-(3,4-dimethoxy-benzaldehyd)-hydrazon-HCl (Subst. B₂)



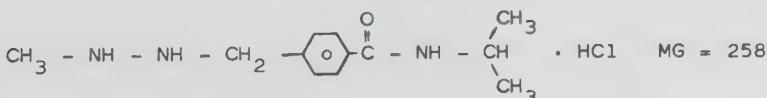
N'-Methyl-N'-β-chloräthyl-(4-dimethyl-aminobenzaldehyd)-hydrazon-HCl (Subst. B₃)



N'-Methyl-N'-β-chloräthyl-(4-hydroxy-benzaldehyd)-hydrazon-HCl (Subst. B₄)



4-(2-Methyl-hydrazinomethyl)-N-isopropyl-benzamid (Procarbazin, Natulan^R, Subst. C)



d) Hefe

Bei den Heferversuchen wurde käufliche Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, diploider Stamm) der Fa. Moormann, Werne/Westf., verwendet. Es wurde darauf geachtet, daß die Hefe möglichst rasch nach der Zulieferung verarbeitet wurde.

e) Hefenährmedium

Glukose-Salzlösung nach WILLIAMSON und SCOPES, 1960, modifiziert nach LANGBEHN, 1972:

Glukose	34,00 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,98 g
KCl	0,74 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,51 g
$\text{Ca Cl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,35 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	13,60 g
Zitronensäure	5,04 g
Aqua dest.	ad 1000,00 ml

Diesem Nährmedium wurden zur Erzielung optimaler Vermehrungsraten folgende Vitamine zugemischt.

Vit. B ₁	10^{-6} g/l
Vit. B ₆	10^{-6} g/l
Biotin	10^{-7} g/l

f) Tiermaterial und Tierhaltung

Die Versuche wurden an männlichen Albinoratten (Stamm Wistar, Zentralinstitut für Versuchstierzucht, Hannover) durchgeführt. Die Tiere wurden je nach Gewicht in Dreier- bis Fünfergruppen in Makrolonkäfigen bei klimatisierten Stallverhältnissen und zwölfstündigem Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Trockenfutter (Ssniff, Intermast GmbH, Soest/Westf.) und Trinkwasser aus Saugflaschen stand ad libitum zur Verfügung. Den Ratten wurde eine Eingewöhnungszeit von mindestens zwei Wochen gewährt. Das Gewicht der Tiere lag bei den Kinetik- und Hemmversuchen bei 350-400 g, bei den Versuchen zur Lebertoxizität bei 230 g und bei den Schlafversuchen um 150 g.

II. Methoden

1. Zur Analytik von N-Methyl-N-β-chloräthylhydrazin (A₁)

Drei funktionelle Gruppen der Subst. A₁ können analytisch erfaßt werden:

- a) β-Chloräthylgruppe
- b) NH₂-Gruppe
- c) N-Methylgruppe

1.1. Bestimmung der β-Chloräthylgruppe

1969 veröffentlichten SAWICKI und SAWICKI, 1969, eine Übersicht verschiedener Nachweisreagenzien auf alkylierende Substanzen. Die meisten Verbindungen besitzen eine Pyridinstruktur, die in 4-Position an ein konjugiertes System gekoppelt ist. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind das 4-(4-Nitrobenzylpyridin (NBP) (Lit. 24, 26, 32, 64, 65, 71, 76), sein Perchlorat (PREUSSMANN et al., 1969) und das 4-Pyridincarboxaldehyd-2-benzothiazolylhydrazon (PBH) (SAWICKI et al., 1963, und NORPOTH et al., 1973).

1.1.1. Reaktion mit 4-Pyridincarboxaldehyd-2-benzothiazolylhydrazon (PBH)



Als autokatalytische und sehr empfindliche Nachweismethode beschrieben SAWICKI et al., 1963, den Nachweis von Alkyljodiden

mit PBH. NORPOTH et al., 1973, verwandten dieses Reagenz zum Nachweis alkylierender Substanzen in der Dünnschichtchromatographie und fanden eine Bestätigung der hohen Nachweisempfindlichkeit.

Reagenz

Das nach SAWICKI et al., 1963, frisch synthetisierte PBH wurde 3 %ig in einem Acetophenon-Dimethylformamid (7:3) Gemisch gelöst und zu 100 ml mit 0,01 ml konzentrierter Salzsäure aufgefüllt.

Messung

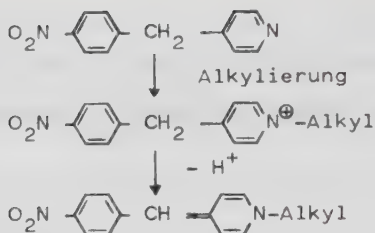
Zu 1 ml einer Acetophenontestlösung wurde 1 ml Reagenz gegeben und die Mischung für 15 min auf 180° C erhitzt. Nach Abkühlung in Eiswasser wurde mit einer 2 %igen Trihexylaminlösung in Acetophenon zu 4 ml aufgefüllt. Die Absorption wurde unmittelbar nach Zugabe der Base bestimmt.

Empfindlichkeit

Da das Absorptionsmaximum der mit Subst. A₁ versetzten Probe mit 400 nm sehr dicht bei dem des Blindwertes (375 nm) lag, konnte diese Methode zur quantitativen Bestimmung von Subst. A₁ nicht angewandt werden.

1.1.2. Reaktion mit 4-(4-Nitrobenzylpyridin) (NBP)

Als weiteres sehr gebräuchliches Nachweisreagenz auf alkylierende Agentien hat sich NBP erwiesen. Es wurde erstmals von KOENIGS et al., 1925, beschrieben und von EPSTEIN et al., 1955, zum Nachweis von Alkylhalogeniden und Äthylenimininen benutzt.



Die häufigste Anwendung findet diese Substanz der Literatur zufolge in der DC-Plattenanalytik und beim Nachweis in rein organischen Lösungsmitteln, die aufgrund ihrer Polarität optimale Nachweisbedingungen schaffen. Zur quantitativen Bestimmung im wässrigen, biologischen Milieu aber, wie im vorliegenden Fall, mußte zunächst eine optimale Methode ausgearbeitet werden.

Durch Variation der Reaktionsbedingungen und Ausschaltung zahlreicher Störfaktoren, die durch das biologische Milieu auftraten, konnte folgende reproduzierbare Methode erarbeitet werden, die als Modifikation der Bestimmung nach FRIEDMAN und BOGER, 1961, anzusehen ist.

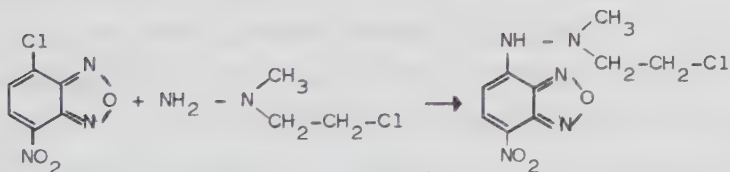
Die zu untersuchende Testlösung wurde zu 3 ml derart mit Nährmedium aufgefüllt, daß dieses ein Drittel des Volumens ausmachte. Nach Zugabe von 1 ml 5 %iger NBP-Lösung in Aceton wurde kräftig durchgeschüttelt und für 20 Minuten bei 100° C im Trockenschrank erhitzt. Anschließend wurde im Eisbad abgekühlt und mit 2 ml Aceton sowie 5 ml Acetessigester versetzt. Unmittelbar vor der Messung erfolgte dann die Zugabe von 1,5 ml 0,25 N Natronlauge. Die Probe wurde kräftig geschüttelt und nach kurzer Zentrifugation die blaugefärbte organische Phase zur photometrischen Bestimmung verwendet (Eppendorf-Photometer, 546 nm). Die Auswertung erfolgte über eine Eichkurve. ($\Delta E = 0,1 \hat{=} 6,8 \mu\text{g/ml}$; $d = 1 \text{ cm}$)

Es war darauf zu achten, daß nach dem Alkalisieren die Messung möglichst rasch erfolgte, da der Farbkomplex unbeständig ist.

1.2. Bestimmung der NH₂-Gruppe

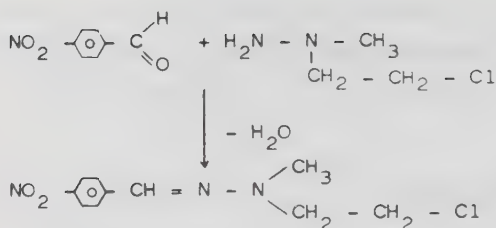
1.2.1. Reaktion mit 7-Chlor-4-nitrobenzofurazon (NBD-Cl)

Erste Versuche zum Nachweis der freien NH₂-Gruppe wurden mit NBD-Cl durchgeführt. Dieses Reagenz dient allgemein zur Bestimmung von Aminen, Aminosäuren, Peptiden und Sulfonamiden. Für den vorliegenden Zweck war es jedoch nicht geeignet, da sich keine ausreichend stabile Färbung für eine exakte photometrische Messung ausbildete.



1.2.2. Reaktion mit 4-Nitrobenzaldehyd

Wesentlich besser gestaltete sich der Nachweis mit 4-Nitrobenzaldehyd. Die Bildung des gelbgefärbten Hydrazons erwies sich als sehr empfindlich und gut reproduzierbar.



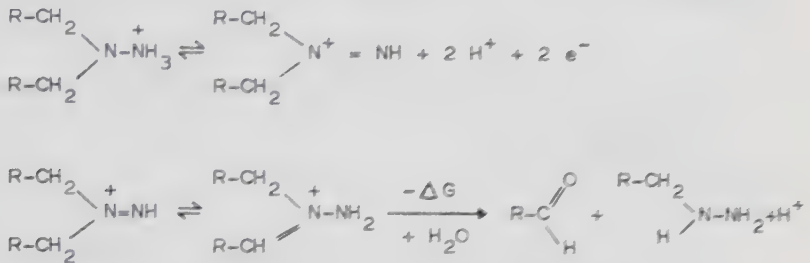
Nach Durchführung zahlreicher Vorversuche, die zur Beseitigung von Störeffekten durch das biologische Medium dienten und zur Ermittlung einer optimalen Konzentration des Reagenzes führten, kam folgende Methode zur Anwendung:

Zu 2 ml Probelösung wurde 1 ml Hefenährmedium, 0,1 ml 0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH = 4,0) und 1 ml 0,05 %ige 4-Nitrobenzaldehyd-Lösung in Äthylenglykolmonomethyläther gegeben. Nach 20-minütigem Erhitzen auf 120° C im Trockenschrank wurde im Eisbad abgekühlt, mit Aqua dest. zu 20 ml aufgefüllt und gut durchgemischt. Die Messung erfolgte bei 400 nm (Zeiss Photometer PMQ II). Als Blindwert diente ein analoger Ansatz ohne Subst. A_1 ($\Delta E = 0,1 \pm 6,1\%$ /ml, $d = 1$ cm).

1.3. Bestimmung der N-Methylgruppe

PREUSSMANN et al., 1968, beschrieben eine Methode zur photometrischen Bestimmung von 1,1 Dialkylhydrazinen. Dabei überführten sie mit Hilfe einer 0,1 %igen Quecksilber-II-sulfat-Lösung in 10 %iger Schwefelsäure die Alkylgruppen quantitativ in die entsprechenden Aldehyde. Die Ausbeute wurde bezogen auf die Oxydation einer Alkylgruppe (= 100 %). Bei unterschiedlichen Alkylresten, wie z.B. beim Methylpropylhydrazin, entsteht ein

Aldehydgemisch (Formaldehyd 39 %, Propionaldehyd 61 %). Der Mechanismus der oxydativen Desalkylierung in stark saurem Medium gibt die Reaktionsfolge nach McBRIDE, 1957, wieder:



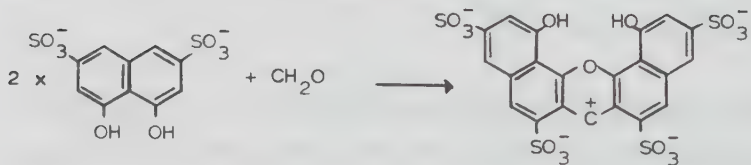
Die Aldehydabspaltung ist protonenkatalysiert und nur in Gegenwart eines Oxidationsmittels mit genügend hohem Oxidationspotential durchführbar.

In den von PREUSSMANN et al., 1968, angegebenen Nachweisgrenzen zwischen 0,2 und 2 μ Mol ließen sich keine oxydativen Spaltprodukte der Subst. A₁ in Form von Aldehyden aus rein wässriger Lösung nachweisen. Bei Bestimmung im Hefenährmedium wurde aus der Glukose infolge Zersetzung durch die Schwefelsäure Formaldehyd frei. Diese Ergebnisse zwangen zur Abänderung der Analysenmethode. Als stärkeres Oxidationsmittel wurde Kaliumdichromat eingesetzt und als Protonendonator Essigsäure. Eine 1 %ige K₂Cr₂O₇-Lösung in 30 %iger Essigsäure stellte sich als optimales Oxidationsgemisch heraus. Zur N-Alkylgruppenbestimmung ergab sich somit folgende Methodik:

Eine Probelösung, die 0,2 bis 2 μ Mol Subst. A₁ enthält, wurde mit 4 ml einer 1 %igen Kaliumdichromatlösung in 30 %iger Essigsäure versetzt, mit Aqua dest. zu 21 ml aufgefüllt und in eine

Mikrodestillationsapparatur überführt. Anschließend wurden 20 ml in eine graduierte, mit Eiswasser gekühlte Vorlage überdestilliert und aus dem Destillat die Aldehydbestimmungen vorgenommen.

2. Formaldehydbestimmung nach der Chromotropsäuremethode
(MacFADYEN, 1945)

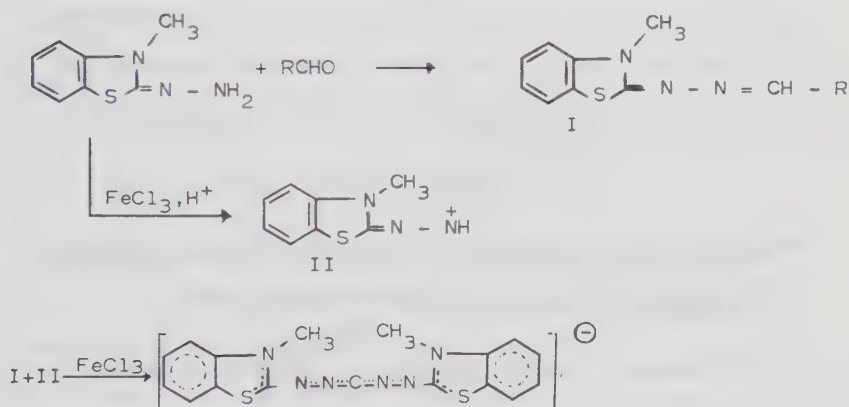


10 ml des Destillates wurden mit 2 ml einer wässrigen 5 %igen Chromotropsäurelösung sowie 20 ml konz. Schwefelsäure versetzt und 10 Minuten im Wasserbad auf 90°C erhitzt. Nach Abkühlen im Eisbad wurde mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt. Als Blindwert diente ein formaldehydfreier Ansatz. Die Messung erfolgte bei 578 nm am Eppendorf Photometer. ($\Delta E = 0,1 \hat{=} 4,5 \mu \text{CH}_2\text{O/ml}$, $d = 2 \text{ cm}$).

3. Aldehydbestimmung mit 2-Hydrazono-2,3-dihydro-3-methylbenzothiazol (HMBT) (SAWICKI et al., 1961)

5 ml einer wässrigen 0,4 %igen HMBT-Lösung und 5 ml Destillat wurden gemischt und nach 30 min mit 25 ml einer 0,2 %igen Eisen-(III)-chloridlösung versetzt. Nach 5 min wurde mit Aceton

auf 100 ml aufgefüllt und die auftretende Färbung bei 670 nm gegen einen Leerwert der entsprechenden Mischung der Reagenzlösungen gemessen. Der Formaldehydgehalt wurde mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt, die mit einer standardisierten Formaldehydlösung (HORNING, 1946, und BOHME, 1968) erstellt worden war. ($\Delta E = 0.1 \hat{=} 4.7 \times \text{CH}_2\text{O/ml}$, $d = 1 \text{ cm}$).



4. Formaldehydbildung unter dem Einfluß von Kaliumhexacyano- ferrat-(III)

Eine Lösung von jeweils 10^{-3} M Substanz und 10^{-3} M Kaliumhexacyanoferrat-(III) wurde nach Einstellen in ein Wasserbad bei 37° C unter Rühren mit Luft durchperlt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und der Formaldehydgehalt sofort nach der Chromotropsäure-Methode bestimmt. Durch Parallelansätze aus reinen 10^{-3} M Substanzlösungen und aus einer 10^{-3} M Kaliumhexacyanoferrat-III-Lösung wurde eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Autoxidation der Substanzen oder durch Einwirkung des Oxidationsreagenzes auf die Bestimmungsmethode ausgeschlossen.

5. Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na durch
Hydrazinderivate

Zu 50 ml einer 10^{-4} M Lösung von 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7.4) wurden die Hydrazinderivate äquimolar bei 37° C gelöst. In regelmäßigen Abständen wurden Proben von 2 ml entnommen, mit 2 ml eisgekühltem Phosphatpuffer verdünnt, kräftig durchgeschüttelt und umgehend bei 600 nm gegen eine Kontrolle ohne Substratzusatz gemessen.

6. Beeinflussung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
(GAPDH)-Aktivität durch Methylhydrazinderivate

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte nach BERGMAYER, 1974.

Testansatz:

2,50 ml Triäthanolamin Puffer (0,1 M; pH = 7.6)	82,5 mM
0,20 ml Glycerat-3-P, CHA-Salz (50 mg/ml)	6,0 mM
0,10 ml ATP, Na-Salz (20 mg/ml)	1,1 mM
0,10 ml EDTA (10 mg/ml in Puffer)	0,9 mM
0,05 ml $MgSO_4$ (0,1 M)	1,7 mM
0,05 ml NADH, Na-Salz (10 mg/ml)	0,2 mM
0,01 ml PGK (10 mg/ml)	14,8 U/ml
0,02 ml Enzymlösung in Puffer	

Die Substanzen A_1 , B_1 , B_2 , B_3 und C wurden in dem Triäthanolamin-Puffer 10^{-3} M gelöst. Nach Zusatz von GAPDH wurden die Lösungen bei 25° C in dicht verschlossenen Reaktionsgefäßen gerührt und nach jeweils 0, 1, 2, 4, 6 und 8 Stunden eine

Probe entnommen. Zur Auswertung diente die Abnahme der Extinktion bei 366 nm, die mit Hilfe eines Kompensationsschreibers (Eppendorf 4410) registriert wurde. Dabei wurde als Meßwert die Zeit der halbmaximalen Umsetzung festgelegt. Der jeweilige Kontrollwert ohne Substanzzusatz wurde zu jedem Zeitpunkt gleich 100 % gesetzt.

7. Zum Vergleich der Alkylierung von NBP und NBP-Perchlorat durch N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinderivate

NBP: 0,5 μ Mol Substanz wurde in 1 ml Wasser gelöst und mit 1 ml einer 5 %igen NBP-Lösung in Äthylenglykolmonomethyläther versetzt. Das Gemisch wurde für 60 min bei 100° C im Trockenschrank erhitzt und nach schnellem Abkühlen in Eiswasser mit 0,5 ml Piperidin und Äthylenglykolmonomethyläther auf 5 ml aufgefüllt. Die Farbmessung erfolgte innerhalb von 90 sec nach Zugabe des Piperidins bei 570 nm gegen einen entsprechend behandelten Blindwert. Als Bezugssubstanz diente N-Dimethyl-N- β -chloräthylamin.

NBP-Perchlorat: Um äquimolare Reaktionsbedingungen zu erhalten, wurde das NBP-Perchlorat in 7,34 %iger Lösung eingesetzt. In allen übrigen Punkten stimmte die Methodik mit der der NBP-Bestimmung überein.

8. Bestimmung der Bildung einer Aziridiniumstruktur

In einer $3 \cdot 10^{-2}$ M NaHCO_3 -Lösung wurden die Substanzen 10^{-3} M gelöst und bei 37° C im Wasserbad gerührt. Der pH-Wert der Lösungen lag zwischen pH 7.4 und 7.6. Zu definierten Zeit-

punkten wurden 20 ml entnommen und der Chloridgehalt nach VOLHARD (BÖHME u. HARTKE, 1968) bestimmt.

9. Adsorptive Bindung der Subst. A₁ an die Hefezellwand

In 40 ml einer 10^{-3} M Hydrazinlösung wurden 2 g mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschene Hefezellen suspendiert und 30 min gerührt. Zwei in dieser Weise aufbereitete Proben wurden anschließend für 10 min bei 1500 g zentrifugiert und die Überstände zur Bestimmung der β -Chloräthylgruppe aufbewahrt. Eines der Hefesedimente wurde nun in 40 ml 2 %iger CaCl_2 -Lösung und das andere in 40 ml Aq. bidest aufgenommen und erneut 30 min gerührt. Anschließend wurde wie oben zentrifugiert und aus den erhaltenen Überständen ebenfalls die Chloräthylgruppe bestimmt.

10. Bilanz-Versuch

Unsynchronisierte Hefezellen wurden 2 mal mit 0,9 %iger Kochsalzlösung gewaschen und das erhaltene Hefesediment 3 %ig in Nährmedium, das die Subst. A₁ in 10^{-3} M Konzentration enthielt, aufgenommen. Die Suspension wurde bei 30°C unter ausreichender Luftdurchperlung gehalten. Als Vermehrungsfaktoren waren von Beginn an die Vitamine B₁, B₆ und Biotin zugesetzt. In bestimmten Abständen wurden aus dem Ansatz Proben entnommen und durch Filtration über ein Porenfilter (Fa. Sartorius, Göttingen, Porenweite 3μ) geerntet. Das Hefegewicht wurde bestimmt und aus dem Filtrat der Gehalt von Subst. A₁ mit Hilfe der erarbeiteten Nachweismethoden ermittelt.

11. Mikrosomenpräparation und Aufbereitung

a) Vorbehandlung

24 Stunden vor Beginn der Kinetik- und Hemmversuche wurden den Ratten Futter, aber nicht das Wasser, entzogen. Ebenso wurden die induzierten Tiere behandelt, denen vor der Leberentnahme an drei aufeinanderfolgenden Tagen 100 mg/kg Na-Phenobarbital in Wasser bzw. 20 mg/kg 3-Methylcholanthren in Olivenöl appliziert worden waren.

b) Leberentnahme

Die Ratten wurden durch Dislokation der Halswirbelsäule getötet und nach Dekapitation ausgeblutet. Zwei Paramedianschnitte eröffneten Abdomen und Thorax weit und legten die Leber frei, die unverzüglich herauspräpariert und in eiskalter 1,15 %iger KCl-Lösung abgespült wurde. Das feuchte Lebergewicht einer Gruppe von jeweils drei bis fünf Ratten wurde bestimmt. Grob zerschnitten wurden die Lebern zweimal im gleichen Volumen einer eiskalten 0,25 M Saccharoselösung gewaschen, bevor sie im fünffachen Volumen 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 7.4) portionsweise mit Hilfe eines Pistill-Homogenisators nach POTTER-ELVEHJEM (Teflon Pistill, Glasgefäß) unter ständiger Eiskühlung homogenisiert wurden.

c) Fraktionierung der Mikrosomen

Durch Zentrifugation in einer Christ Tischzentrifuge bei 10500 g für 30 min bei 2° C wurden Mitochondrien, Zellkerne und Zell-

trümmer sedimentiert. Der Überstand wurde daraufhin bei 5° C und 104000 g 1 Stunde zentrifugiert. Das erhaltene Mikrosomen-pellet wurde vorsichtig unter ständiger Eiskühlung mit einem Hand-homogenisator in 0,1 M Phosphatpuffer (pH = 7.4) suspendiert. Das Flüssigkeitsvolumen der Suspension war so bemessen, daß das Endvolumen dem Leberfeuchtgewicht in Gramm entsprach.

d) Proteinbestimmung nach LOWRY, 1951

Die unter B II. 11. c. erhaltene Mikrosomensuspension wurde vor der Proteinbestimmung 1 : 10 mit Phosphatpuffer (pH = 7.4) verdünnt und dann wie folgt aufgearbeitet:

Lowry-Reagenz:

Lösung A: 2 %ige Na_2CO_3 -Lösung in 0,1 N NaOH

B₁: 1 %ige $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ Lösung

B₂: 2 %ige K-Na-tartrat-Lösung

B: gleiche Volumina B₁ und B₂ vor Gebrauch mischen

C: 50 ml Lösung A und 1 ml Lösung B unmittelbar vor Gebrauch mischen

D: 1 ml Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz mit 1,36 ml dest. Wasser mischen

E: 0,1 %ige Rinderalbuminlösung (Merck)

F: 5 %ige Natriumdesoxycholatlösung

In einer Doppelbestimmung wurden 0,1 und 0,2 ml Mikrosomenverdünnung mit 0,1 ml Lösung F versetzt, um, wenn vorhanden, einen proteinhaltigen Niederschlag in Lösung zu bringen. Mit dest. Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt.

Nach Zugabe von 4 ml Lösung C wurde das Gemisch 10 Minuten lang stehen gelassen, danach mit 0,5 ml Lösung D versetzt und kurz kräftig gemischt. Nach 30 min wurde die Extinktion bei 660 nm im Zeiss-Photometer (PMQII) gegen einen Leerwert, bestehend aus 0,1 ml Lösung F und 0,9 ml Phosphatpuffer, in dem die jeweilige Proteinprobe gelöst war - übriger Ansatz wie oben angegeben - gemessen. Der Proteingehalt wurde aus der Extinktion anhand einer Eichkurve ermittelt. Als Eichsubstanz diente Rinderalbumin (Lösung E), das in definierten Mengen in einem Gesamtvolumen von 1 ml, wie oben beschrieben, behandelt wurde und dessen Extinktionswerte der Eichkurve zugrunde lagen.

e) Bestimmung von Cytochrom P 450

Die unter B. II. 11. c. gewonnene Mikrosomensuspension wurde auf 2 mg Protein pro ml mit 0.1 M Phosphatpuffer (pH = 7.4) verdünnt und zu je 2 ml in zwei Küvetten gegeben. Vor der Bestimmung wurde die Basisextinktion der Lösung im Bereich von 500-360 nm im Zeiss Spektralphotometer DMR 21 registriert. Zur Bestimmung des Gehalts von Cytochrom P 450 wurde die Meßküvette 30 sec mit Kohlenmonoxid durchperlt und anschließend Vergleichs- und Meßküvette mit einigen Körnchen Natriumdithionit reduziert. Das anschließend aufgenommene CO-Differenzspektrum diente der Auswertung. Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach folgender Formel,

$$C = \frac{E}{\epsilon \cdot d}$$

wobei der von OMURA und SATO, 1964, ermittelte Extinktionskoeffizient ($\epsilon = 91 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) für den Wellenbereich von 450 - 490 nm eingesetzt wurde.

Die Aufarbeitung nach B. II. 11. c. - B. II. 11. e. wurde stets an einem Tag durchgeführt und die Mikrosomen bei -25°C eingefroren.

12. Registrierung der Bindungsspektren

Je 2 ml einer Mikrosomensuspension (1 mg Protein/ml) aus Lebern von mit Phenobarbital (PB) vorbehandelten Ratten wurden in zwei Küvetten mit einer Schichtdicke $d = 5\text{ cm}$ gegeben. Nach Aufnahme der Basisextinktion wurde die zu untersuchende Substanz zum Inhalt der Meßküvette gegeben und bei Raumtemperatur das Differenzspektrum von 500 - 360 nm registriert.

13. N-Demethylierung durch Lebermikrosomen in vitro

a) Enzymansatz:

Das Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen:

I. NADP	0,5 μMol gelöst in	0,05 ml Aq.bidest.
II. MgCl	5 μMol gelöst in	0,05 ml Aq.bidest.
III. MnCl_2	0,1 μMol gelöst in	0,05 ml Aq.bidest.
IV. Isocitronen- säure	5 μMol gelöst in	0,05 ml Aq.bidest.
V. Isocitratdehy- drogenase (ICDH)	0,5 I.E. gemischt mit	0,05 ml Phosphat- puffer (pH 7.4)
VI. Mikrosomales Protein	5 mg aufgefüllt zu	0,75 ml mit Phosphat- puffer (pH 7.4)
VII. Substrat bis 1 μMol gelöst in		1,00 ml mit Phosphat- puffer (pH 7.4)
Gesamtansatz		2,00 ml

Die Lösungen wurden vor jedem Versuch frisch angesetzt. Als Vorlage für dieses Reaktionsgemisch dienten die Arbeiten von WITTKOP et al. , 1969. Lediglich die Mn^{++} -Ionen-Konzentration wurde mit einer Zehnerpotenz höher eingesetzt, da diese, die die Aktivität der ICDH katalysieren, durch Phosphationen maskiert werden (Biochemica-Information, 1974).

b) Versuchsdurchführung

Die gemeinsam gelösten Substanzen I - IV wurden mit der Lösung V vereinigt und den aufgefüllten Mikrosomensuspensionen zugegeben. Nach guter Durchmischung wurden je 1 ml dieses Gemisches den bereitgestellten Substratlösungen zupipettiert. Direkt anschließend wurde durch Einstellen der Proben in ein auf 37° C temperiertes Schüttelbad die Reaktion gestartet und 40 min unter ständigem Schütteln bei freier Luftzufuhr gehalten. Die Umsetzung wurde durch Abkühlen in Eiswasser und Zugabe von 1 ml 20 %iger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Als Inkubationsgefäße dienten genormte Zentrifugengläser.

c) Blindwert

Als Blindwert diente ein Ansatz, bei dem vor Versuchsbeginn das mikrosomale Protein durch Aufkochen denaturiert war. Als metabolische Aktivität wurde die Differenz zwischen Blindwert und Probe gesetzt. Von jedem Substratansatz wurden drei Proben gegen einen Blindwert gemessen.

d) Aufarbeitung des Inkubationsgemisches

Der flockige Niederschlag wurde bei 1500 g sedimentiert und dem klaren Überstand 2 ml zur Metabolitenbestimmung entnommen.

14. Formaldehydbestimmung nach NASH, 1953

Formaldehyd als Metabolit wurde nach der Nash-Methode mit Reagenz B (pH = 6.3) bestimmt. 2 ml Probe wurden mit gleichem Volumen Reagenz gut durchgemischt und nach 1 Stunde bei 412 nm gegen Aq. bidest. gemessen. Zur Eichung diente eine nach der Dimedonmethode (HORNING u. HORNING, 1946) eingestellte Formaldehydlösung, die in definierten Mengen in einem Gesamtvolumen von 2 ml, wie zuvor beschrieben, behandelt wurde und deren Extinktionswerte der Eichkurve zugrunde lagen.

15. Bestimmung des 4-Nitrophenols (KATO u. GILLETTE, 1965)

Die O-Demethylierung des 4-Nitroanisols wurde durch Messung von 4-Nitrophenol bestimmt. Hierzu wurden 2 ml des TCA-Überstandes mit 1 ml einer 10 %igen Natronlauge alkalisiert und die entstehende Gelbfärbung nach 1 Stunde photometrisch bei 410 nm gegen Aq. bidest. gemessen. Allgemein war es nötig, die durch ausgeflocktes $Mg(OH)_2$ getrübbten Proben vor der Messung zu zentrifugieren. Zur Auswertung wurden die Extinktionswerte ins Verhältnis gesetzt.

16. Bestimmung des p-Aminophenols (KATO, GILLETTE, 1965)

Die Bestimmung der Hydroxylierung von Anilin erfolgte durch die Messung des gebildeten p-Aminophenols. Der Metabolisierungsprozeß wurde durch rasches Abkühlen im Eisbad und Zugabe von 0,6 g NaCl abgebrochen. Aus den mit Kochsalz gesättigten Proben wurde mit 3 ml peroxidfreiem Äther das p-Aminophenol extrahiert und 2 ml der Ätherphase mit 2 ml einer 0,1 M NaOH-Lösung, in der zu einem Prozent Phenol gelöst war, ausgeschüttelt. Nach Abhebern der Ätherphase und einer Reaktionszeit von 30 min wurde die in der wässrigen Phase entstandene Blaufärbung photometrisch bei 620 nm gegen Aq. bidest. gemessen. Zur Auswertung wurden die Extinktionswerte ins Verhältnis gesetzt.

17. Hemmung der mikrosomalen N-Demethylierung von N-Methylhydrazinderivaten durch

a) SKF 525-A und Metirapon

Die Hemmstoffe wurden vor Versuchsbeginn der gekühlten Mikrosomen-suspension in einem solchen Quantum zugegeben, daß eine Endkonzentration von 10^{-7} Mol/ml resultierte. Um Nebenreaktionen der Hemm-substanzen auszuschließen, wurden die Blindwerte gleich behandelt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter B.II.13. beschrieben.

b) Na-Desoxycholat

Nach Zusatz von 1 % Na-Desoxycholat (Endkonzentration) wurden die Mikrosomen für 60 min unter ständigem Rühren im Wasserbad (37° C) vorinkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter B.II.13. angegeben.

c) ∞

Bei den CO -Hemmversuchen wurden für 5 min Kohlenmonoxid in die eisgekühlte Mikrosomensuspension eingeleitet und anschließend mit Stickstoff überschichtet. Die Probepreparation erfolgte wie unter B.II.13. angegeben. Unmittelbar bevor die fertiggestellten Proben mit durchbohrten Gummistopfen, die durch Kanülen und Polyäthylenschläuche verbunden waren, um die Inkubationsgemische zu überströmen, verschlossen wurden, wurde der Ansatz nochmals vorsichtig für 5 Sekunden mit CO unter Kühlung durchperlt. Das geschlossene System wurde dann mit einem CO/O_2 -Gemisch im Verhältnis 9:1 überströmt. Die Reaktion wurde durch Einstellen ins temperierte Schüttelbad gestartet, nachdem etwa 2 Minuten lang zum Ausgleich des Belüftungssystems mit dem CO/O_2 -Gemisch begast worden war.

18. Gewinnung der Mikrosomenfraktion aus Ehrlich-Ascitescarzinomzellen

Zehn Tage nach Inokulation von 10^7 Ehrlich-Ascitescarzinomzellen wurden zwanzig Mäuse durch Genickbruch getötet, der Ascites steril der Bauchhöhle entnommen und heparinisiert unter Eiskühlung gerührt. Die Zellen wurden 2 mal mit 0,9 %iger NaCl gewaschen, bei 250 g abzentrifugiert, unter Eiskühlung ultrabeschallt (Sonifier, Fa. Branson sonic Power, Bamberg; Stufe 8, 10 A) und der Zellbrei nach B.II.13. aufbereitet.

19. Bestimmung der Hexobarbital-Schlafzeit

Vier Stunden nach Vorbehandlung mit unterschiedlichen Dosen der Testsubstanz bekamen die Ratten 100 mg/kg Hexobarbital-Na (Evipan-Na^R) in wässriger Lösung i.p. appliziert. Als Schlafdauer galt der Zeitraum zwischen dem Zeitpunkt, zu dem sich die Tiere in Seitenlage bringen ließen und der Wiedererlangung des Stellreflexes. Mit den Versuchen wurde stets am Vormittag zur selben Zeit unter künstlicher Beleuchtung (Tagesrhythmus) begonnen.

C. E R G E B N I S S E

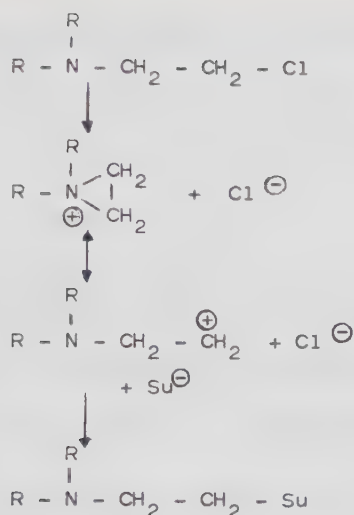
=====

1. Untersuchungen zur chemischen Reaktivität in vitro

1. Alkylierungsvermögen

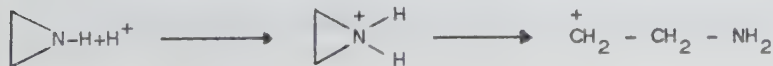
Als alkylierende Agentien bezeichnet man organische Verbindungen, die aufgrund ihrer chemischen Struktur in der Lage sind, nukleophile Zentren ihrer Reaktionspartner unter Übertragung eines Alkylrestes zu substituieren. Als Substratmoleküle sind sowohl negativ geladene Ionen als auch neutrale Moleküle mit freiem Elektronenpaar anzusehen. Physiologisch spielen hier Hydroxyl-, Mer-capto-, Phosphorsäureester- und Carboxylat-Gruppen sowie stickstoffhaltige Verbindungen mit freiem Elektronenpaar eine Rolle.

Man unterscheidet bei der Alkylierung zwei Mechanismen; die Substitution 1. Ordnung (SN_1) und die Substitution 2. Ordnung (SN_2). Bei der nukleophilen Substitution 1. Ordnung (SN_1) findet bei dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, der Anlagerung des elektrophilen Alkylans an das nukleophile Substratmolekül, nur eine einzige Bindungsumordnung statt. Bei der nukleophilen Substitution 2. Ordnung (SN_2) finden im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt zwei Bindungsumgruppierungen statt; es wird ein Übergangszustand durchlaufen, bei dem die Ladungen annähernd gleichmäßig auf alle Reaktionspartner verteilt sind. Fast alle Alkylierungen, die von biologischem Interesse sind, verlaufen als nukleophile Substitutionen 2. Ordnung. So alkyliert z. B. eine Stickstofflostverbindung, nachdem sie sich nach einem SN_1 Mechanismus zum hochreaktiven Aziridiniumion umgelagert hat, nach dem SN_2 Mechanismus sein biologisches Substrat.



1.1. Vergleichende Versuche mit NBP und NBP-Perchlorat

Beide Reagenzien finden bei der Analytik alkylierender Agentien Anwendung. Ein wesentlicher Unterschied beider Verbindungen liegt darin, daß bei NBP das freie Elektronenpaar als nukleophiles Zentrum vorliegt und direkt einer Substitutionsreaktion zugänglich ist. Das NBP-Perchlorat dagegen kann nicht unmittelbar mit einem Alkylhalogenid reagieren (PREUSSMANN et al., 1969), weil das für die nukleophile Substitution notwendige freie Elektronenpaar bei diesem Reagenz durch Protonierung besetzt ist. Umso empfindlicher reagiert es jedoch mit Äthylenimin und Epoxyden. Durch Protonierung wird die Ringspannung erhöht und der Ring öffnet sich leichter unter Bildung eines elektrophilen Carbenium-Ions.

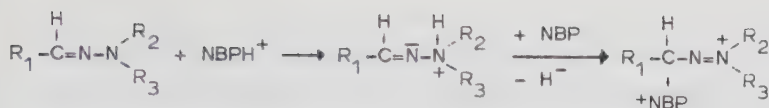


Bei den vorliegenden N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinderivaten liegt aber bereits als Zwischenprodukt eine solche Aziridiniumstruktur vor, die nicht mehr zur Aufnahme eines Protons im Sinne eines Äthyleniums befähigt ist.

Tab. 1: Umsetzung von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazinderivaten mit NBP bzw. NBP-Perchlorat. Subst. D = N-Dimethyl-N- β -chloräthylamin. Die Ergebnisse stellen den jeweiligen Mittelwert aus 6 Versuchen dar (Methodik, s. B.II.7.).

	Subst. D	Subst. A ₁	Subst. B ₁	Subst. B ₂	Subst. B ₃	Subst.C
NBP	Ex.=1.237	0.924	0.394	0.697	0.486	--
NBP-Perchlorat	0.040	0.122	0.050	0.109	0.120	--

Trotzdem tritt, wie aus Tabelle 1 hervorgeht, eine Reaktion mit NBP-Perchlorat ein. Da das N-Dimethyl-N- β -chloräthylamin nicht mit NBP-Perchlorat, wohl aber sehr stark über eine intermediäre Aziridiniumstruktur mit NBP reagiert, kann letztere nicht für die Reaktion von den Substanzen B₁, B₂ und B₃ mit NBP-Perchlorat zur Erklärung herangezogen werden. Es muß also neben dem Alkylierungsmechanismus, für den die β -Chloräthylgruppe verantwortlich ist, noch einen weiteren Alkylierungsweg geben. PREUSSMANN et al., 1969, versuchen die Reaktion zwischen Alkylhydrazonen und NBP-Perchlorat über eine Anlagerung des deprotonierten NBP an die C-N-Doppelbindung zu erklären.



Da aber auch das Hydrazin (Subst. A₁) mit NBP-Perchlorat reagiert, scheint dieser Mechanismus zweifelhaft. Es ist jedoch denkbar, daß aus einer Methylhydrazinium- bzw. -hydrazoniumstruktur ein Alkyl-Kation auf das deprotonierte NBP-Perchlorat übertragen wird.



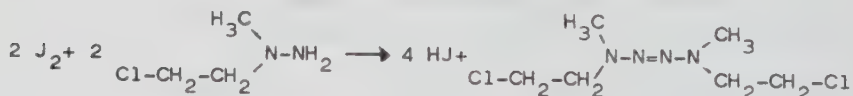
Solche Methylierungsreaktionen durch Phenylmethyllummoniumverbindungen sind bereits bekannt und laufen um so leichter ab, je geringer die Elektronendichte des Ammoniumstickstoffes ist. Für diese Annahme spricht die steigende Reaktivität der untersuchten Verbindungen in Abhängigkeit von der Basizität des jeweiligen Hydrazinstickstoffatoms.

1.2. Bestimmung der Bildung des Aziridiniums

Mit Thiosulfationen kann die Äthylenimmoniumstruktur einer Verbindung direkt erfaßt werden (17, 27, 28, 45). Mit diesem Verfahren wurde eine Quantifizierung der Aziridiniumbildung bei den einzelnen

Substanzen versucht. Die Bestimmungen zeigten jedoch keine befriedigenden Ergebnisse. Vielmehr wurde die jodometrische Rücktitration des Thiosulfates durch das Redoxverhalten der Subst. A₁ empfindlich gestört. Ein exakter Umschlag des Indikators war nicht zu erkennen.

Setzt man einer Lösung von Subst. A₁ in Umkehrung der Bestimmungsmethode zunächst die Jodlösung zu und titriert dann nach einer Reaktionszeit von 20 min mit Thiosulfat zurück, so werden vier Äquivalente Jod verbraucht, was auf die oxidative Bildung einer Tetrazenstruktur hindeutet. Eine solche oxidative Überführung von unsymmetrisch substituierten Hydrazinen zu entsprechenden Tetrazenen wurde bereits von SMITH, 1966, beschrieben.



Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des Aziridiniumionenanteils ist die Erfassung des bei seiner Entstehung freiwerdenden Chloridions.



Die Kinetik der Chloridionenbildung wurde nach B.II.8. bestimmt.

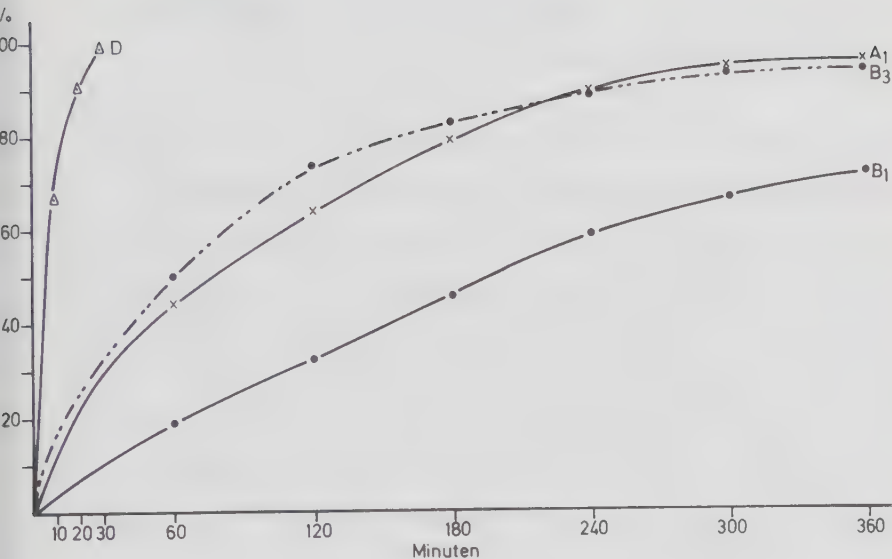


Abb. 1: Zeitabhängige durch die Bildung einer Aziridiniumstruktur bedingte Chloridfreisetzung aus den Subst. A₁, B₁, B₃ und D (N-Dimethyl-N-β-chloräthylamin)

Wie aus Abb. 1, in der der zeitabhängige prozentuale Umsatz wiedergegeben ist, hervorgeht, läuft diese S_N1 Reaktion bei N-Dimethyl-N-β-chloräthylamin, Subst. D, erwartungsgemäß wesentlich rascher ab als bei den Chloräthylhydrazinen, da die Aziridiniumbildung eine Funktion der Nukleophilität des chloräthyltragenden Stickstoff darstellt. Infolgedessen läuft auch die Reaktion bei der Subst. B₁ erheblich langsamer ab als bei Subst. A₁. Der Verlust der Nukleophilität durch die Hydrazonbildung wird aber durch Einfügen des p-Dimethylaminosubstituenten (B₃) wieder ausgeglichen.

1.3. Hemmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase durch
die Substanzen A₁, B₁, B₂, B₃ und C

Nach Feststellung der eindeutig alkylierenden Aktivität unter unphysiologischen Bedingungen und im Hinblick auf die Beeinflussung der aeroben Glykolyse (BRAUN et al., 1976) war unter dem nach B. II. 6. beschriebenen Versuchsablauf das Aktivitätsverhalten der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in Gegenwart der Substanzen A₁, B₁, B₂, B₃ und C zu überprüfen. Dieses Leitenzym der Glykolyse gilt als eines der empfindlichsten Enzyme gegen oxidierende und alkylierende Einflüsse. Es kann zugleich als Modell für das chemische Verhalten proteinogener Thiolgruppen dienen, da SH-Blocker, die dieses Enzym inaktivieren, grundsätzlich auch gegenüber zahlreichen anderen empfindlichen SH-Proteinen des Zellstoffwechsels als Hemmstoffe anzusehen sind.

Tab. 2: Zeitabhängige GAPDH-Aktivität unter dem Einfluß verschiedener N-Methylhydrazinderivate. Zu jedem Zeitpunkt wurde die Restaktivität der Kontrolle gleich 100 % gesetzt.

Substanzen	1 Std.	2 Std.	4 Std.	6 Std.	8 Std.
Subst. A ₁	87,5 %	68,6 %	61,3 %	53,4 %	43,1 %
Subst. B ₁	93,3 %	84,7 %	85,3 %	82,4 %	84,1 %
Subst. B ₂	90,9 %	86,7 %	80,6 %	75,2 %	73,1 %
Subst. B ₃	75,3 %	48,6 %	16,6 %	6,9 %	3,9 %
Subst. C	90,9 %	77,4 %	71,3 %	61,3 %	47,5 %

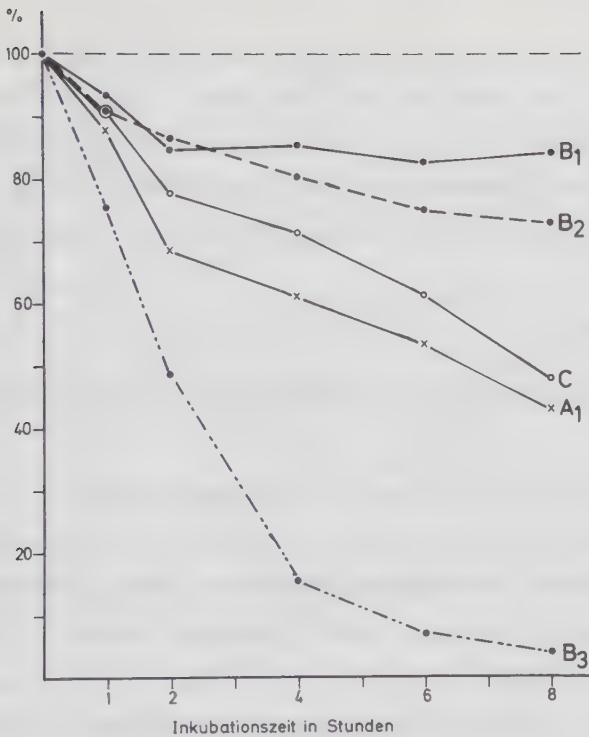


Abb. 2: Aktivität der GAPDH nach Inkubation mit verschiedenen Methylhydrazinderivaten

Die zusammengefaßten Ergebnisse in Tab. 2 und Abb. 2 zeigen, daß besonders die Subst. B₃ die Aktivität der GAPDH hemmt und innerhalb von 8 Stunden fast völlig aufhebt. Subst. B₃ ebenso wie die weit schwächer aktiven Substanzen B₁ und B₂ können aufgrund ihrer Struktur nur über eine Alkylierung die Aktivität der GAPDH mindern. Als wirksames Prinzip der Substanzen A₁ und C muß im Falle der GAPDH-Hemmung auch die kontinuierliche Bildung von Wasserstoffperoxyd diskutiert werden (WEITZEL et al., 1967 u. 1967 sowie HEFTER). Wenn auch H₂O₂ gegenüber SH-Fermenten nur mäßige Hemmwirkung besitzt, so ist doch in Anbetracht der langen Inkubations-

zeiten und der hohen Oxydationsempfindlichkeit des Enzyms eine partielle Enzym-Inaktivierung durch das gebildete H_2O_2 nicht auszuschließen. Die Kontrollwerte nahmen während der längsten Inkubationsdauer (8 Std.) auf etwa die Hälfte (56 % Hemmung) ab.

2. Redoxverhalten

2.1. Untersuchung zur Redoxwirkung verschiedener Hydrazinderivate

Hydrazin und seine Derivate sind oxidationsempfindlich. Es war deshalb interessant, etwas über das Verhalten der zu untersuchenden Hydrazinderivate gegenüber Oxidantien zu erfahren. Vorversuche zeigten, daß sowohl ammoniakalische Silbernitratlösung als auch 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na (Tillman's Reagenz) durch Subst. A_1 reduziert wurden. 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na kann als Redox-indikator angesehen werden, dessen Potential im physiologischen Bereich liegt. Untersuchungen nach B.II.5 mit Tillman's Reagenz sollten im Vergleich mit 1,1-Dimethylhydrazin (A_3), Hydrazinsulfat (A_4) und Methylhydrazin (A_2) einen Einblick in das Redoxverhalten der Substanzen A_1 , B_1 und C geben.

Wie aus Abb. 3 hervorgeht, reduzieren bis auf das Hydrazon B_1 alle untersuchten Substanzen, wobei dieser Prozeß bei Subst. C, Methylhydrazin (A_2) und 1,1-Dimethylhydrazin (A_3) jedoch nach 60 bzw. 120 min wieder rückläufig ist. Die Subst. A_1 sowie Hydrazinsulfat (A_4) zeigen diesen Effekt nicht.

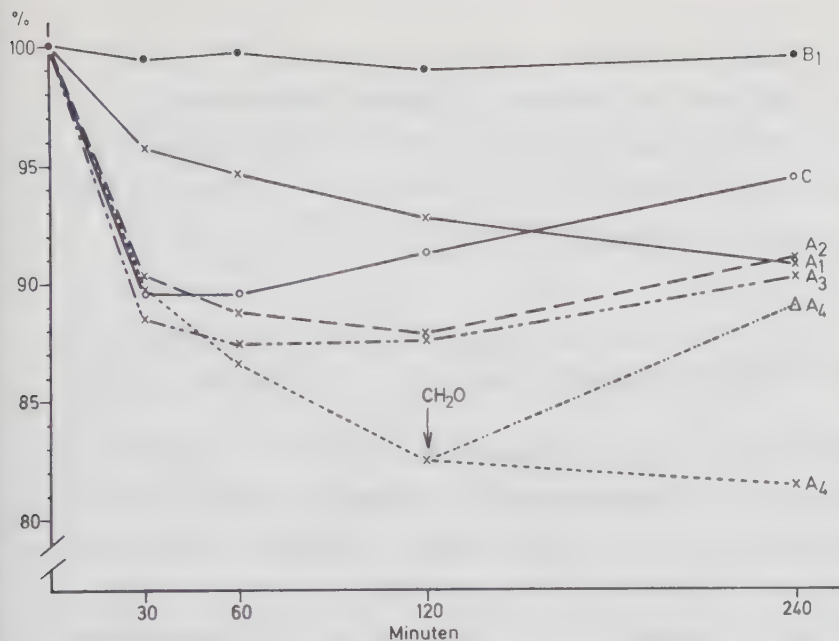
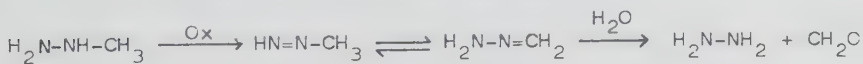


Abb. 3: Zeitabhängige Reduktion von 2,6-Dichlorphenolindophenol durch verschiedene Hydrazinderivate, ΔE der Kontrolle zu jedem Zeitpunkt wurde gleich 100 % gesetzt.

BOUHON, 1973, fand, daß Monomethylhydrazine unter den beschriebenen Bedingungen Formaldehyd abzuspalten vermögen. Zu analogen Befunden kamen WEITZEL et al., 1966, bei der Oxidation von Subst. A_2 mit Kaliumhexacyanoferrat-(III).



Ein solcher Oxidationsschritt ist bei der Hydrazonstruktur (B_1) nicht möglich. Das aus den Methylhydrazinen gebildete Formaldehyd kann das reduzierte 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na wieder oxidieren

und wird selbst zu Methanol reduziert, womit der rückläufige Prozeß zu erklären ist. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß die Zugabe von Formaldehyd (10^{-4} M) nach 120 min zum Hydrazinansatz ebenfalls eine Oxidation des reduzierten Farbstoffes auslöst (s. Abb. 2).

2.2. Aldehydbildung aus Subst. A₁

Nach PREUSSMANN et al., 1968, sind bei verschiedenen substituierten Hydrazinen beide Alkylreste nach Oxidation unter nicht physiologischen Bedingungen als Aldehyde nachweisbar. Bei Subst. A₁ haben wir als Substituenten eine Methyl- und eine β -Chloräthylgruppe, die demnach als Formaldehyd bzw. β -Chloracetaldehyd abgespalten werden können. Letzteres ist aufgrund seiner Unbeständigkeit nur schwer analytisch zu erfassen und somit nur durch eine indirekte Methode bestimmbar. Aus dem nach B.II.1.3. erhaltenen Destillat wurde deshalb sowohl nach der Chromotropsäuremethode, die spezifisch Formaldehyd erfaßt, als auch mit HMBT, das allgemein mit aliphatischen Aldehyden reagiert (SAWICKI et al., 1961), der Aldehydgehalt bestimmt. Zuvor war an Hand einer Formaldehydverdünnungsreihe festgestellt worden, daß beide Methoden zu übereinstimmenden Ergebnissen führen.

Tab. 3

Chromotropsäure Nachweis	HMBT Nachweis
89,8 $\pm$ 7,0 % (n = 4)	102,3 $\pm$ 2,4 % (n = 4)

Aus Tab. 3 geht hervor, daß die Seitenkettenoxidation etwa zu 90 % die Methylgruppe und nur zu 10 % die β -Chloräthylgruppe betrifft.

2.3. Formaldehydbildung aus den Substanzen A_1 , B_1 und C unter milder Dehydrierung mit Kaliumhexacyanoferrat-(III)

WEITZEL et al., 1964, 1966, 1967 fanden bei Untersuchungen über den cytostatischen Wirkmechanismus von Methylhydrazinen, daß diese Substanzen unter milder oxidativer Dehydrierung mit Kaliumhexacyanoferrat-(III) in vitro Formaldehyd abspalten. Da es sich bei den neu entwickelten Substanzen A_1 und B_1 ebenfalls um Methylhydrazinderivate handelt, die cytostatische Wirkung zeigen, wurden sie im Vergleich zum Procarbazin (Subst. C) entsprechend den nach B.II.4. beschriebenen Bedingungen untersucht.

Abb. 4 gibt den deutlichen Unterschied zwischen der Subst. C und den Substanzen A_1 sowie B_1 wieder. Aus der Subst. C werden innerhalb von 4 Std. 31 % der Theorie an Formaldehyd freigesetzt. Dieser Betrag korreliert mit den Ergebnissen von WEITZEL et al., 1964, 1966, die 35 % fanden. Die Substanzen A_1 und B_1 dagegen zeigen nur eine sehr schwache Formaldehydbildung.

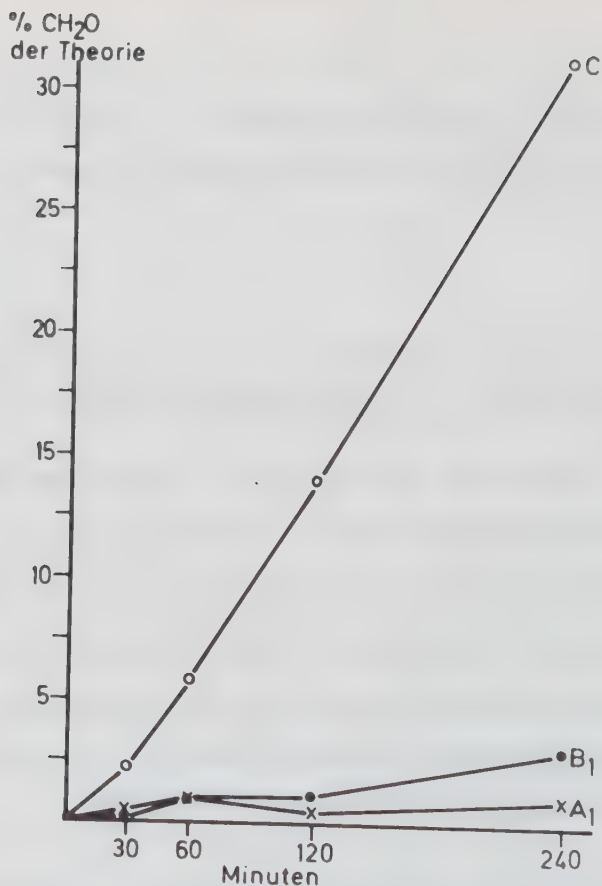


Abb. 4: Zeitabhängige Formaldehydbildung aus den Subst. A₁, B₁ und C unter Kaliumhexacyanoferrat-(III)

II. Untersuchung zur mikrosomalen N-Demethylierung

Unter dem Begriff Metabolismus faßt man alle chemischen Veränderungen von körpereigenen oder von außen zugeführten Stoffen zusammen, die durch Stoffwechselprozesse oder andere enzymatische Leistungen der Zelle, vor allem der Leberzelle, verursacht werden. Einen Hauptanteil dieser metabolischen Prozesse stellen oxidative Reaktionen dar, die vorwiegend am glatten endoplasmatischen Retikulum ablaufen. Dieses Retikulum kann bei der Zellfraktionierung als Mikrosomenfraktion unter Beibehaltung der enzymatischen Aktivität isoliert werden. So ist es möglich, den mikrosomalen Metabolis-

mus in vitro zu studieren. Als Schlüsselenzym der mischfunktio-
nellen Oxidation fungiert das Cytochrom P 450.

BRAUN und HEFTER, 1976, fanden bei in vitro-Untersuchungen zur
Struktur-Wirkungs-Beziehung von N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenz-
aldehydhydrazonen an Hand der Hemmwirkung auf den Uridin- bzw.
Thymidineinbau in Ehrlich-Ascitescarzinom-Zellen, daß die Einbau-
hemmung eine grundlegende Eigenschaft der Methylhydrazonstruktur
darstellt, die durch die Einführung einer β -Chloräthylgruppe ver-
stärkt wird. Aus diesem Grunde war es von Interesse, durch in
vitro Versuche am Modell der Lebermikrosomen der Ratte das Schick-
sal der N-Methylgruppe bei verschiedenen Hydrazonderivaten und
der Subst. A₁ zu verfolgen. Die oxidative Abspaltung der Methyl-
gruppe kann als Sekundärreaktion nach primärer Hydroxylierung
der N-Methylgruppe aufgefaßt werden. Ähnliche Untersuchungen
waren bereits von PROUGH et al., 1969, 1970, am Procarbazin,
seiner Azoverbindung und an einfachen Methylhydrazinen durchge-
führt worden. BAGGIOLINI et al., 1969, konnten bei der Ratte in
vivo und der isoliert perfundierten Leber an radioaktiv markier-
tem Procarbazin eine N-Demethylierung nachweisen. Procarbazin
(Subst. C) wurde deshalb als Vergleichssubstanz mituntersucht.
Ausgehend von den Substanzen A₁, B₁ und C wurden im Laufe der
Versuche noch die Weiterentwicklung B₂ und B₃ in die Versuche
mit einbezogen.

1. Versuche zur Standardisierung des mikrosomalen Systems in vitro

a) Substrateinsatz

Vorversuche ergaben, daß die von WITTKOP et al., 1969, eingesetzte Substratmenge von 20 μMol pro Probe (2 ml) die Kapazität des Systems weit überschreitet, da hier offensichtlich eine übermaximale Konzentration vorliegt. Außerdem war wegen der schlechten Löslichkeit der Substanzen B_1 , B_2 und B_3 bei einer so hohen Dosierung eine Abschätzung der Konzentration an gelöstem Material nicht möglich. Demgegenüber erwiesen sich Konzentrationen bis zu 1 μMol pro 2 ml Probeansatz als weitaus günstiger.

b) Formaldehydbildung unter dem Einfluß des NADPH-regenerierenden Systems allein.

Das NADPH-regenerierende System wird dem Blindwert erst nach Hitze-Denaturierung zugesetzt. Die Beobachtung hoher Blindwerte, insbesondere bei Subst. A_1 ließen die Frage aufkommen, ob es sich hier um einen Substanzzerfall handelt oder die freigesetzte Formaldehydmenge allein eine Funktion des als Redoxsystem fungierenden regenerierenden Systems darstellt. Um diese Frage zu klären, wurde konzentrationsabhängig eine reine Substanzlösung mit einer Substanzlösung plus regenerierendem System unter Versuchsbedingungen verglichen.

Abbildung 5 zeigt die unterschiedliche CH_2O -Bildung allein unter dem Einfluß des regenerierenden Systems. Während Subst. B_1 kein Formaldehyd abspaltet, werden Subst. C und noch weit deutlicher Subst. A_1 durch dieses System beeinflusst. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen durchweg mit den Blindwerten bei den später folgenden konzentrationsabhängigen Versuchen mit nicht induzierten

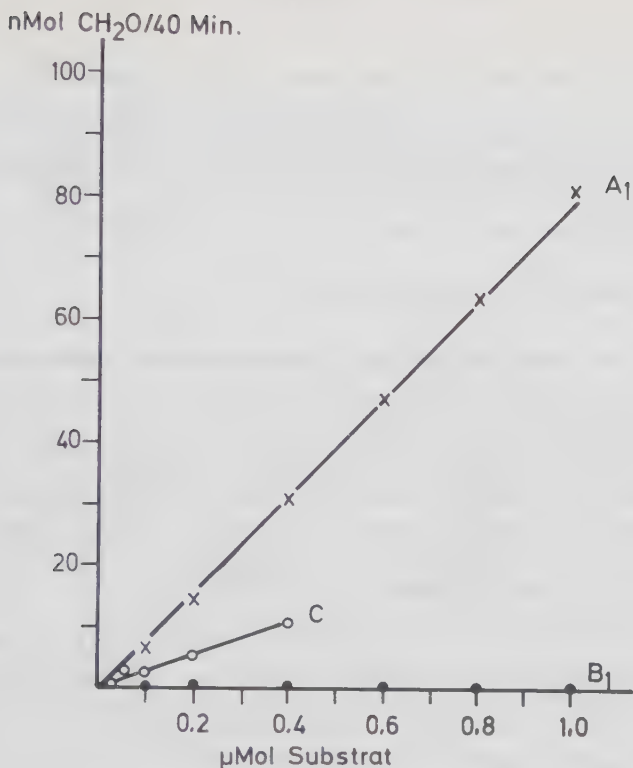


Abb. 5: Konzentrationsabhängige Formaldehydbildung aus den Substanzen A₁, B₁ und C unter Einfluß des NADPH-regenerierenden Systems allein

Lebermikrosomen überein. Hieraus läßt sich ableiten, daß die gebildeten Formaldehydmengen der Blindwerte allein durch das regenerierende System bedingt sind und die Mikrosomenaktivität durch Aufkochen beseitigt ist. Ob nun im Probeansatz das regenerierende System im gleichen Ausmaß seine Wirkung auf die CH₂O-Bildung entfaltet, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da hier das gebildete NADPH auch von den gemischt funktionellen Oxidasen verbraucht wird; es wird aber zunächst bei Versuchsauswertung vorausgesetzt. Bemerkenswert ist, daß das NADPH-regenerierende System im Gegensatz zum Kaliumhexacyanoferrat-(III) in der Lage

ist, Formaldehyd aus Subst. A₁ freizusetzen. Dies deutet darauf hin, daß unter dem Einfluß des regenerierenden Systems eine anders geartete Oxidationsreaktion abläuft als unter Kaliumhexacyanoferrat-(III).

c) Faktorbestimmung für die Nash-Methode

Der Formaldehydnachweis nach NASH, 1953, kann durch Amine gestört werden, die die Funktion des NH_4^+ -Ions bei der Hantzsch-Reaktion kompetitiv zu beeinflussen vermögen, indem sie selbst mit Acetylaceton reagieren. Hierdurch kommt es zu einem Nachweisverlust. WITKOP et al., 1969, bestimmten deshalb einen Korrekturfaktor. Hierzu wurde 1 ml Substratlösung mit 1 ml 20 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt, bevor 1 ml Mikrosomensuspension mit regenerierendem System und einer bekannten Menge CH_2O hinzugegeben wurde. Diese Zugabefolge verhindert eine enzymatische Formaldehydfreisetzung, erlaubt aber im Vergleich mit einem Blindwert gleicher Zusammensetzung ohne Substrat die Berechnung einer Nachweisdifferenz. Die Aufbereitung der Blindwerte und Proben erfolgte im übrigen wie unter B.II.13 beschrieben.

Tab. 4: Korrekturfaktoren bei der Formaldehydbestimmung nach NASH

	Faktoren bei 20 μMol Substrateinsatz	Faktoren bei 1 μMol Substrateinsatz
Subst. A ₁	1,6	1,1
Subst. B ₁	1,3	1,0
Subst. C	5,5	1,0

Der für Subst. C ermittelte Wert bei einem Substrateinsatz von 20 μMol liegt mit 5,5 etwas unter dem von WITKOP et al., 1969, gefundenen Wert von 6,2. Die Substanzen A₁ (1,6) und B₁ (1,3) stören den Nash-Nachweis weit weniger.

Bei einem Substrateinsatz von nur 1 μMol und weniger wird die Empfindlichkeit des Formaldehydnachweises nicht beeinflusst, womit sich bei den hier beschriebenen Versuchen eine Korrektur erübrigt.

d) Bestimmung der Löslichkeit von Subst. B_1

In der Regel wurden für einen Inkubationsansatz aus einer 10^{-3} M Lösung der Substanzen in eisgekühltem Phosphatpuffer bis zu 1 ml entnommen. Selbst in dieser geringen Konzentration war die Subst. B_1 nicht vollständig gelöst, was an kleinen Öltropfen festgestellt werden konnte. Es war deshalb für die richtige Relation zu den anderen Substanzen von Interesse, den gelösten Substratgehalt des Hydrazons zu bestimmen. Dies konnte nur nach vorhergehender Ermittlung eines Extinktionskoeffizienten geschehen. Hierzu wurden fünf verschiedene Konzentrationen angesetzt, von denen gegen das Lösungsmittel ein UV-Absorptionsspektrum erstellt wurde.

Tab. 5: Extinktion und Extinktionskoeffizienten von Subst. B_1 bei unterschiedlichem Substrateinsatz

Konzentration in Mol/l	$E_{290 \text{ nm}}$	ϵ
$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,110	8800
$5 \cdot 10^{-5}$	0,220	8800
10^{-4}	0,440	8800
$5 \cdot 10^{-4}$	1,420	5680
10^{-3}	1,860	3720

Tab. 5 zeigt, daß die Subst. B_1 bis zu einer Konzentration von 10^{-4} Mol/l voll in Lösung geht und ihr Extinktionskoeffizient bei 5°C $8800 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ beträgt.

Zur Ermittlung des tatsächlichen Hydrazongehaltes in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe wurden einer 10^{-3} M Hydrazonlösung 0,1 - 1,0 ml entnommen und jeweils bis 2 ml mit 0,1M Phosphatpuffer ($\text{pH} = 7,4$) aufgefüllt, was dem Inkubationsvolumen entsprach. Gegen eine reine Pufferlösung wurde von jeder Konzentration ein Spektrum erstellt und die jeweiligen Maxima bei 290 nm mit Hilfe des errechneten Extinktionskoeffizienten ausgewertet (Tab. 6).

Tab. 6: Verhältnis der theoretisch eingesetzten und praktisch gefundenen Konzentration von Subst. B_1 unter Versuchsbedingungen

Theoretische Konzentration	Gefundene Konzentration	Faktor
$5 \cdot 10^{-5}$	$3,63 \cdot 10^{-5}$	1,4
10^{-4}	$0,67 \cdot 10^{-4}$	1,5
$2 \cdot 10^{-4}$	$1,30 \cdot 10^{-4}$	1,5
$3 \cdot 10^{-4}$	$1,84 \cdot 10^{-4}$	1,6
$4 \cdot 10^{-4}$	$2,43 \cdot 10^{-4}$	1,7
$5 \cdot 10^{-4}$	$3,08 \cdot 10^{-4}$	1,6

Bei den Auswertungen wurde jedoch auf eine Korrektur mit dem gemittelten Faktor von 1,55 verzichtet, da während der Inkubation mit Nachlösung der Substanz zu rechnen ist.

e) Aktivität des 100 000 g Überstandes

Im Cytochrom P 450 freien 100 000g Überstand konnte keine N-Demethylierungsaktivität gefunden werden, was darauf schließen läßt, daß diese metabolische Reaktion an die Mikrosomen gebunden ist.

2. Kinetik der mikrosomalen N-Demethylierung

a) Konzentrationsabhängige Formaldehydbildung bei nicht induzierten Rattenlebermikrosomen

Die drei eingesetzten Substanzen unterscheiden sich in ihrer konzentrationsabhängigen Formaldehydfreisetzung deutlich (Abb. 6).

Das schwer wasserlösliche Hydrazon B_1 zeigt einen Kurvenverlauf, wie er bei WITKOP et al., 1969, auch für das N,N-Dimethylanilin und 1,2-Dimethylhydrazin beschrieben ist. Die N-Demethylierung zeigt ab $0,2 \mu\text{Mol}$ Substrateinsatz eine lineare Abhängigkeit. Das gut wasserlösliche Hydrazin (A_1) dagegen präsentiert einen Kurvenverlauf der auf eine Substrat- bzw. Produkthemmung hinweist. In diesem Zusammenhang müssen aber auch die Ergebnisse unter C.II.1.b. berücksichtigt werden. Die Subst. A_1 nimmt mit zunehmender Konzentration Einfluß auf das regenerierende System, wodurch es ab einer "kritischen" Konzentration zu einer Aktivitätsminderung der

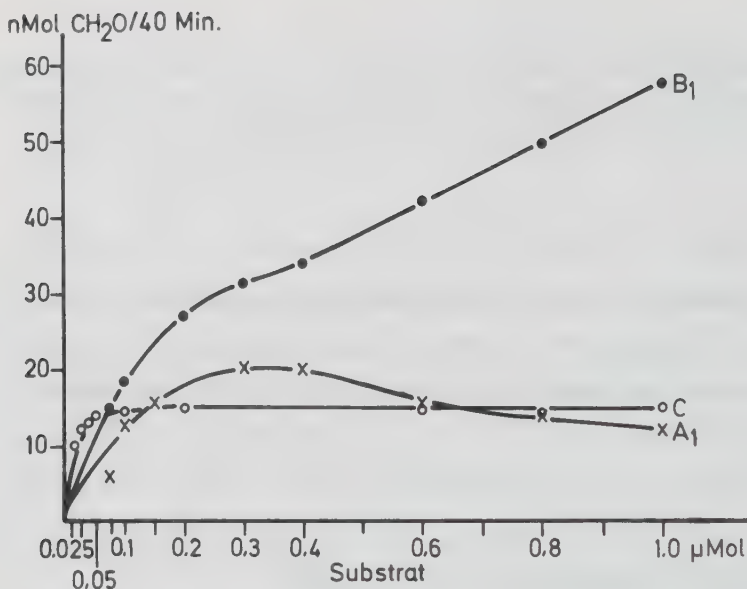


Abb. 6: Konzentrationsabhängige Formaldehydbildung der Substanzen A₁, B₁ und C durch nicht induzierte Rattenlebermikrosomen. Resultat: Differenz zwischen Blindwert und Meßwert; bezogen auf jeweils 5 mg mikrosomales Protein, n = 6

gemischtfunktionellen Oxydasen kommen könnte. Das bedeutet, der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, die Reduktion des Cytochrom P 450 Substratkomplexes wird behindert. Beim ebenfalls gut löslichen Procarbazin (Subst. C) ist schon bei 0,1 µMol Substrateinsatz die maximale Formaldehydbildung erreicht.

WITTKOP et al., 1969, fanden beim Azo-Procarbazin gegenüber Procarbazin eine wesentlich höhere Demethylierungsrate, so daß diese Azoverbindung als eigentliches Substrat für die N-Demethylierung betrachtet werden kann. Nach BAGGIOLINI et al., 1969, sind Lebermikrosomen mit regenerierendem System befähigt, einen solchen

Oxydationsschritt durchzuführen. Der Kurvenverlauf könnte somit auf die Begrenzung dieses Aktivierungsschrittes hindeuten.

b) Konzentrationsabhängige Formaldehydbildung bei PB-induzierten Rattenlebermikrosomen

Eine Mikrosomeninduktion durch Phenobarbital hat auf die N-Demethylierung der Subst. B₁ keinen Einfluß, wie aus Abb. 7 hervorgeht.

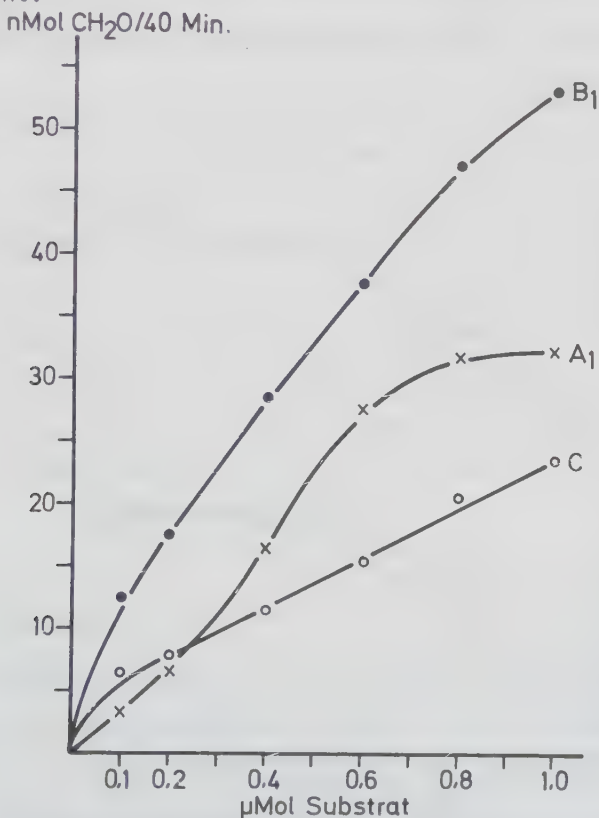


Abb. 7: Konzentrationsabhängige Formaldehydbildung der Substanzen A₁, B₁ und C durch PB-induzierte Rattenlebermikrosomen
Bedingungen wie Abb. 6

Beim Hydrazin (A_1) findet dagegen eine deutliche Umsatzsteigerung statt, die bei höherer Substratkonzentration diesmal nicht rückläufig ist. Auch bei Subst. C wird jetzt eine induzierte, von der Substratkonzentration abhängige Formaldehydbildung gefunden.

c) Zeitabhängige Versuche

Auch in Abhängigkeit von der Zeit zeigt Subst. B_1 im Vergleich zu den Substanzen A_1 und C einen größeren Umsatz durch das mikrosomale System (Abb. 8).

nMol CH_2O

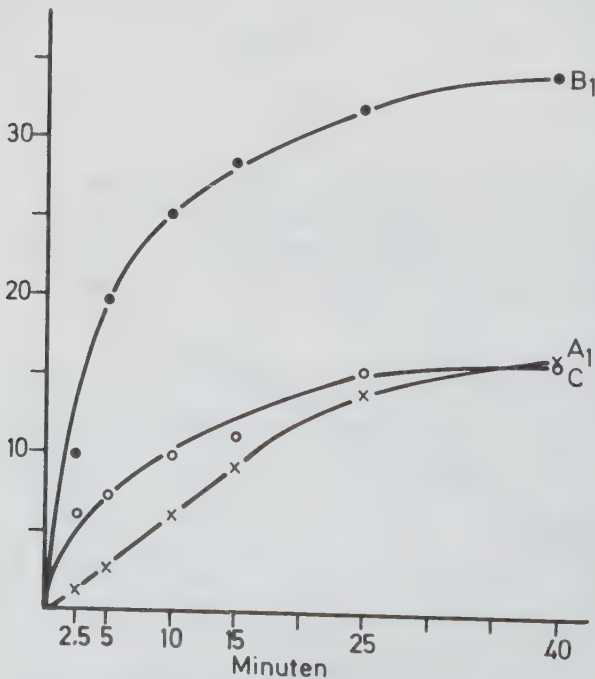


Abb. 8: Zeitabhängige Formaldehydbildung der Substanzen A_1 , B_1 und C bei einem Substrateinsatz von 0,2 μ Mol mit nicht-induzierten Mikrosomen. Bedingungen wie Abb. 6.

Zwischen 25 und 40 min flachen alle drei Kurven ab. Dies ließ eine Inkubationszeit von 40 min für die weiteren Untersuchungen als geeignet erscheinen.

Zusammenfassend zeigen die Versuche zur Kinetik, daß deutliche Unterschiede zwischen dem Reaktionsverhalten des Hydrazons (B_1), des Hydrazins (A_1) und des Procarbazins (C) bestehen. Im Gegensatz zum rein chemischen Verhalten zeigen im mikrosomalen System besonders Subst. B_1 und auch Subst. A_1 eine größere Empfindlichkeit gegenüber metabolischen Angriffen.

Durch die Überführung von Subst. A_1 in ihr Benzaldehydhydrazon B_1 konnte die Toxizität bei gleicher therapeutischer Wirksamkeit gesenkt werden. Deshalb wurden weitere Hydrazone synthetisiert, von denen N¹-Methyl-N¹-B-chloräthyl-(3,4-dimethoxybenzaldehyd)-hydrazon (B_2) und N¹-Methyl-N¹-B-chloräthyl-(4-dimethylaminobenzaldehyd)-hydrazon (B_3) bei in vitro-Untersuchungen an Ehrlich-Ascitescarzinomzellen über eine größere cytostatische Aktivität als Subst. B_1 verfügten (Braun u. Wolf, 1976). Diese Substanzen wurden in die weiteren Versuche mit aufgenommen.

3. Bindungsspektren

Viele Fremdstoffe verändern die Lichtabsorption von Mikrosomen-suspensionen (SCHENKMAN et al., 1967), wobei die spektralen Veränderungen in drei Kategorien, Typ I, Typ II und modifizierten Typ II unterteilt werden. YOSHIDA und KUMAOKA, 1975, untersuchten die Abhängigkeit der Bindungstypen von der chemischen Struktur

des Fremdstoffes. Die Bindung von Typ I wird hervorgerufen durch die Reaktion einer hydrophoben Kohlenwasserstoffverbindung mit dem Proteinanteil des Cytochrom P 450. Für den modifizierten Typ II ist eine Hydroxylgruppe am Substrat verantwortlich, während Verbindungen, die eine basische Aminogruppe tragen, den reinen Typ II ausmachen. Bei den beiden letztgenannten Typen reagieren die funktionellen Gruppen mit dem Häm-Eisen, während hydrophobe Molekülteile auch am Protein des Cytochrom P 450 angelagert sein können. Eine oxidative Metabolisierung ist jedoch nicht unbedingt an eine spektrale Absorptionsveränderung gebunden, genauso wie aus der Existenz eines Bindungsspektrums nicht in jedem Fall auf eine Metabolisierung geschlossen werden kann (UEHLEKE, 1971). Bei einigen Substanzen ist die Intensität der Spektralveränderung direkt von der Konzentration des Substrats abhängig. Bisweilen stimmen die erhaltenen "spektralen Dissoziationskonstanten" K_S mit den K_M -Werten der Substanzen überein (REMMER et al., 1966). Bindungsspektren können also zur Charakterisierung und Einordnung einer neuen Substanz dienen.

Von den Substanzen A_1 , B_1 , B_2 , B_3 und C wurde, wie unter B.II.12. beschrieben, ein Spektrum erstellt. Bei allen fünf Substanzen gestaltete sich die Auswertung recht schwierig, da eindeutige Abweichungen vom Basisspektrum nur schwer feststellbar waren. Nach zahlreichen Versuchen kann man auf die in Tab. 7 angeführten Bindungstypen schließen.

Am eindeutigsten waren die Subst. C dem Bindungstyp II, wie bereits beschrieben (WITTKOP et al., 1969), und B_1 sowie B_2 dem Bindungstyp I zuzuordnen. Subst. B_3 erschwerte die Auswertung durch seine hohe Eigenabsorption (Maximum zwischen 350 u. 300 nm).

Tab. 7: Bindungstypen der untersuchten Substanzen

Subst. A ₁	--
Subst. B ₁	Typ I
Subst. B ₂	Typ I
Subst. B ₃	Typ I
Subst. C	Typ II

Lediglich ein angedeutetes Minimum bei 425 nm läßt auf Bindungstyp I schließen. Subst. A₁ ergab kein eindeutiges Bindungsspektrum. Will man diese Ergebnisse interpretieren, so kann man sagen, daß die Substanzen B₁, B₂ und B₃ einheitlich zum Bindungstyp I gehören und sich hiermit von Subst. C unterscheiden, die, ähnlich wie basische Amine und das Phenylhydrazin, zum Typ II zu rechnen ist. Die nur sehr geringen Absorptionsänderungen machten weitere Untersuchungen zur Kinetik unmöglich.

4. Mikrosomale N-Demethylierung nach Induktion mit Phenobarbital und 3-Methylcholanthren

Eine große Zahl von Substanzen aus den verschiedensten Arzneistoffgruppen und von unterschiedlicher chemischer Struktur sind in der Lage, den mikrosomalen Metabolismus zu induzieren. Dies äußert sich in einem Anstieg der Enzymaktivität, der in erster Linie durch eine Synthesesteigerung und Abbauehemmung der Enzym-

proteine bedingt ist (GREIM, SEIFERT, 1968, und GREIM, 1970).

Die Induktoren werden in zwei große Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe, repräsentiert durch Phenobarbital (PB), stimuliert eine Reihe von Cytochrom P 450-abhängigen Abbauwegen und das Wachstum des glatten endoplasmatischen Retikulums. Die zweite Gruppe, vertreten durch 3-Methylcholanthren (3-MC), bewirkt eine mehr selektive Stimulierung einer anderen Form der Monooxygenase des endoplasmatischen Retikulums. Dadurch wird die Hydroxylierung nur weniger Substrate induziert (SCHULTE-HERMANN, R., 1974). Morphologische Veränderungen am endoplasmatischen Retikulum sind nicht zu erkennen. Das induzierte Hämoprotein unterscheidet sich von der Kontrolle durch seine Substratspezifität und seine spektralen Eigenschaften (Cytochrom P 448). Der Arbeitskreis von GILLETTE (GRAM u. GILLETTE) beobachtete, daß beide Substanzen auf verschiedene Weise induzieren, weil durch gleichzeitige Gabe beider Induktoren ein additiver Effekt hervorgerufen werden konnte.

a) Induktion der Rattenleber

Tab. 8 faßt den Einfluß der Induktoren auf die Rattenleber zusammen. In unterschiedlicher Stärke wird das Lebergewicht, der Proteingehalt und der Gehalt an Cytochrom P 450 beeinflusst, wobei letzterer mit den von PROUGH et al., 1970, erzielten Ergebnis vergleichbar ist. Vereinzelt wurde auch der Gehalt an Cytochrom b_5 nach SCHMUCKER et al., 1967, bestimmt. Hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen, wie es auch von anderen Autoren beschrieben wird (UEHLEKE, 1971, sowie HILDEBRANDT und ESTABROOK, 1971).

Tab. 8: Induktion der Rattenleber durch Phenobarbital und 3-Methylcholanthren

	Zahl der Versuchs- tiere	g Lebergewicht 100 g Körper- gewicht	mg Protein g Leber	nMol Cyto- chrom P450 mg Protein	nMol Cyto- chrom P 450 g Leber
Kontrolle	18	2,42 (100 %)	16,5 (100%)	0,88 (100%)	14,5 (100 %)
3-Methyl- cholanthren (3-MC) 3x20 mg/kg	18	2,73 (113 %)	17,2 (104%)	1,07 (122%)	18,4 (127 %)
Phenobarbital (PB) 3x100 mg/kg	18	3,22 (133 %)	18,5 (112%)	1,60 (182%)	29,6 (204 %)

b) N-Demethylierung durch nicht induzierte, Phenobarbital und
3-Methylcholanthren induzierte Mikrosomen

Mit den unter B.II.11. beschriebenen induzierten und nicht induzierten Rattenlebermikrosomen wurde nach B.II.13. die N-Demethylierungsrate bestimmt, und der Formaldehydgehalt nach der Nash-Methode (B.II.14.) ermittelt. Jeweils 1 μ Mol wurden als Substrat eingesetzt. Die Ergebnisse wurden aus sechs Versuchen mit je 3 Tieren gemittelt, die jeweils getrennt induziert und aufgearbeitet worden waren.

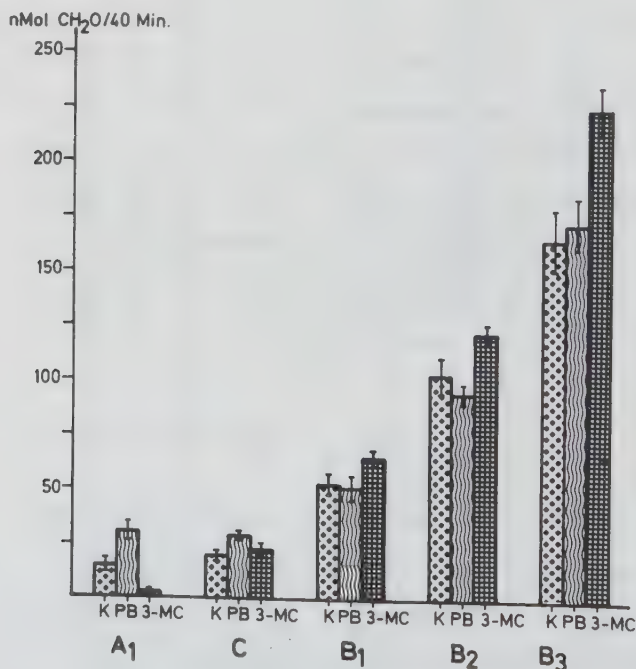


Abb. 9: Formaldehydbildung aus Subst. A₁, B₁, B₂, B₃ und C durch Rattenlebermikrosomen (K = Kontrolle; PB = 3 x 100 mg/kg Phenobarbital; 3-MC = 3 x 20 mg/kg 3-Methylcholanthren)

Das Blockdiagramm (Abb. 9) gibt die Absolutwerte der mikrosomalen Formaldehydbildung wieder. Die Substanzen A_1 , B_1 und C bestätigen die Versuche unter C.II.2. Die neu hinzugenommenen Hydrazone B_2 und B_3 zeigen eine doppelt (B_2) bzw. dreifach (B_3) höhere Demethylierungsrate. Das ist insofern bemerkenswert, weil beide Substanzen zwei weitere zur Demethylierung fähige Methylgruppen aufweisen. Subst. B_2 trägt am Aromaten zwei vicinale Methoxygruppen, und Subst. B_3 bietet die Möglichkeit einer Demethylierung am Anilinstickstoff. Dies würde aber die Aktivität verschiedener Demethylasen bedingen. Wie PROUGH et al., 1969, fanden, existieren neben einer O- bzw. N-Demethylase auch eine N-Methylhydrazin-Demethylase. Da die Demethylasen vom Dimethylanilin und p-Nitroanisol durch PB induzierbar sind, die Formaldehydbildung aus den vorliegenden Hydrazonen jedoch nicht, kann die bei B_2 und B_3 gegenüber B_1 erhöhte Demethylierungsrate, die bei der Kontrolle und nach PB-Induktion gleich ist, nicht alleine auf die Metabolisierung der kernständigen Funktionen zurückgeführt werden.

Die bei B_2 und B_3 erhöhte Demethylierungsrate kann auch durch den +M-Effekt der Kernsubstituenten bedingt sein, woraus eine erhöhte Nukleophilität an dem die Methylgruppe tragenden Hydrazinstickstoff resultiert. Die Bedeutung des +M-Effektes für die N-Demethylierung konnte durch Untersuchungen an N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-(p-hydroxybenzaldehyd)-hydrazon (B_4), das ebenfalls, wenn auch über einen geringeren +M-Effekt als eine Dimethylaminogruppe, verfügt, aber nicht zu einer kernständigen Demethylierung beitragen kann, nachgewiesen werden. Bei B_4 wurde eine gegenüber B_1 um 75 % gesteigerte N-Demethylierungsrate gefunden. Eine eindeutige Klärung scheint jedoch nur

mit radioaktiv markierten Substanzen möglich, die von dieser neuen Verbindungsgruppe noch nicht zur Verfügung stehen.

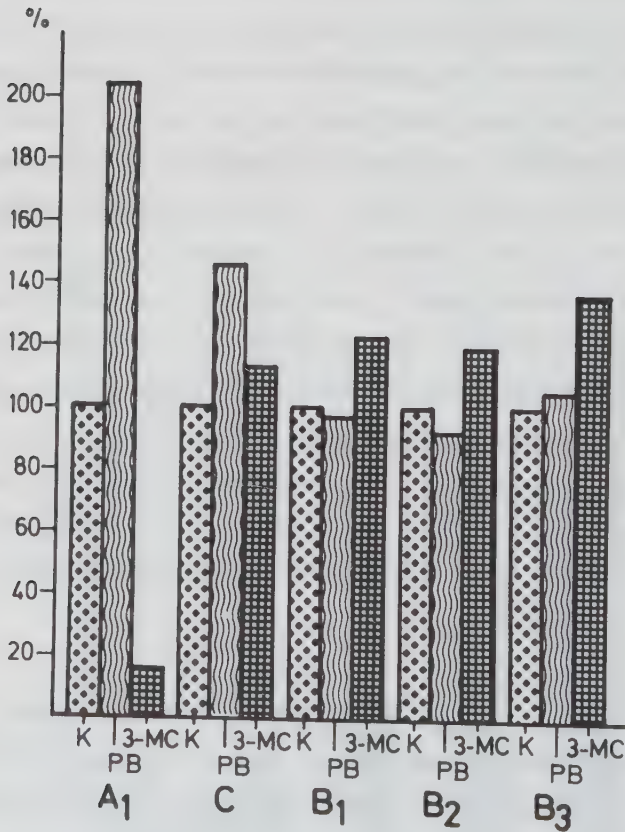


Abb. 10: Formaldehydbildung aus den Subst. A₁, B₁, B₂, B₃ und C durch Rattenlebermikrosomen nach Phenobarbital (PB)- bzw. 3-Methylcholanthren (3-MC)-Induktion in Prozenten der Kontrolle

Abb. 10 gibt die prozentualen Veränderungen wieder. Allein die Demethylierung von Subst. A₁ und C ist durch Phenobarbital induzierbar. Durch Induktion mit 3-Methylcholanthren wird die Demethylierung der Hydrazone im Ausmaß der Cytochrom P 448 Zunahme gesteigert. Ebenso ist eine geringe Umsatzerhöhung beim Procarbazin zu verzeichnen. Bei Subst. A₁ wurden die eindeutigsten Ergebnisse erzielt. Seine Demethylierung wird zu 100 % nach PB-Induktion gesteigert und nach 3-MC-Induktion fast völlig gehemmt.

5. Hemmung der mikrosomalen N-Demethylierung durch SKF 525-A, Metyrapon, CO und Na-Desoxycholat

Neben den Induktoren können auch Inhibitoren wertvolle Hilfsmittel für die Aufklärung biologischer Prozesse sein. Für eine direkte Beeinflussung des Cytochrom P 450 bieten sich unter anderem vier Angriffspunkte an:

- a) Das zur Identifizierung des Cytochrom P 450 benötigte Kohlenmonoxid verdrängt den Sauerstoff aus seiner Bindung am Eisen im Hämprotein und verhindert somit die Oxydation des Substrates.
- b) Der Inhibitor der Steroid 11- β -Hydroxylase Metyrapon entfaltet außer dieser "spezifischen" Wirkung auch einen Hemmeffekt auf die gemischtfunktionellen Oxydasen, in vivo wie in vitro. Wie auch andere Pyridin-Derivate (JONEN et al., 1974) besitzt das Metyrapon, dem Bindungstyp II (NETTER, 1968) zugehörig, die Eigenschaft, sich an reduziertes Cytochrom P 450 anzulagern und dabei ein Absorptionsspektrum bei 446 nm zu erzeugen (HILDEBRANDT et al., 1969). In diesem Punkt weist es also eine

nahe Verwandtschaft zum CO auf und man darf annehmen, daß auch sein Angriffspunkt wie beim CO das Häm-Eisen ist. Zwei Besonderheiten zeichnen jedoch diese Substanz aus. Zumindest für Mäusemikrosomen trifft es zu, daß ein Typ II-Hemmstoff den Umsatz eines Typ I-Pharmakons kompetitiv inhibiert. Mit Hilfe eines sogenannten "Sandwichmodells" vom Aufbau des mikrosomalen Hydroxylase-Komplexes zeigten NETTER et al., 1969, einen Weg zur Klärung dieser und anderer Hemmechanismen auf. Zum anderen beschreibt LEIBMAN, 1969, eine biphasische Wirkung des Metyrapon auf die Hydroxylierung des Acetanilids vom Bindungstyp II. Je nach Metyraponkonzentration ist bei hohen Dosen eine Inhibition und bei niedrigen eine Induktion festzustellen.

c) Das SKF-525-A, der wohl bekannteste Inhibitor, zeigt ein Bindungsverhalten vom Typ I und weist ebenfalls in vivo und in vitro eine Hemmwirkung auf. Es konkurriert um den Bindungs-ort für das Substrat und um den aktivierten Sauerstoff. SCHENKMAN et al., 1972, stellten fest, daß beim Aminopyrin je nach Zugabemodus eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung der N-Demethylierung in vitro zu erzielen ist.

d) Eine vierte Möglichkeit bietet der Einfluß von Detergentien. So löst Na-Desoxycholat Cytochrom P 450 von der Membran ab und wandelt es als gelöstes Produkt zum funktionsun-tüchtigen Cytochrom P 420 um (OMURA und SATO, 1964). Bis auf wenige Ausnahmen wird die N-Demethylierung der Substanzen A₁, B₁, B₂, B₃ und C mit den verschiedenen Hemmstoffen (CO, SKF 525-A, Metyrapon und Na-Desoxycholat) durch un-behandelte sowie Phenobarbital- und 3-Methylcholanthren-

vorbehandelte Rattenlebermikrosome inhibiert (Abb. 11).

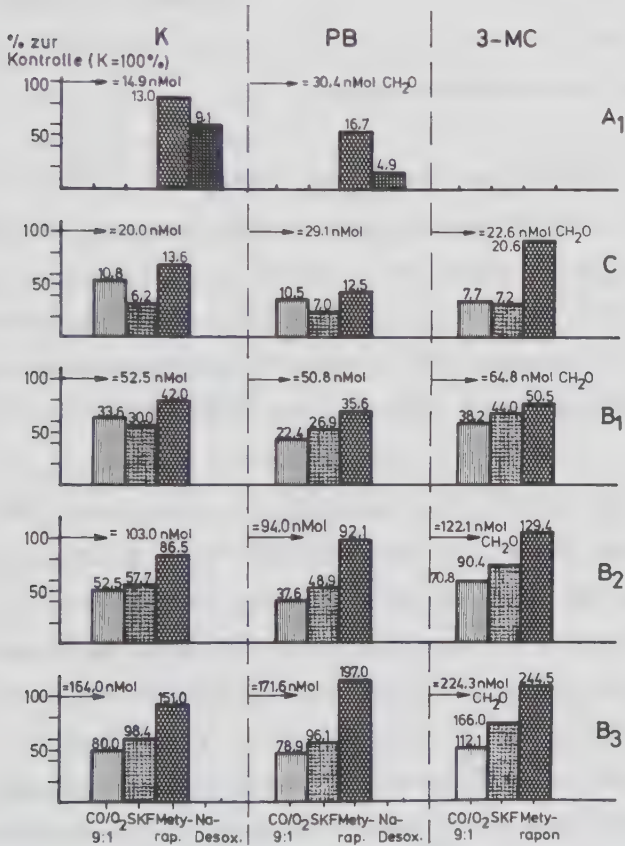


Abb. 11: Hemmung der Demethylierung der Substanzen A₁, B₁, B₂, B₃ und C durch die Inhibitoren CO, SKF 525-A, Metyrapon und Na-Desoxycholat durch Mikrosomen aus unbehandelten sowie durch PB- bzw. 3-MC-induzierten Rattenlebern. Die Absolutwerte (nMol) geben die Umsätze nach 40 Minuten Inkubationszeit wieder.

Die Demethylierung von Subst. A₁ wird durch CO und SKF völlig unterdrückt. Unter Metyrapon und Na-Desoxycholat wurde eine teilweise Hemmung erreicht, die unter PB-Induktion stärker ist. Nach 3-MC-Induktion konnte unter keinem Hemmstoff eine Demethylierung nachgewiesen werden.

Betrachtet man die Absolutwerte der Hemmversuche bei der Subst. C für nicht induzierte und PB-induzierte Mikrosomen, so stellt man Übereinstimmung fest. Der durch PB-Induktion erzielte Anstieg der Demethylierung wird also durch CO, SKF und Metyrapon aufgehoben. Auffallend ist die nur geringfügige Hemmung der Formaldehydbildung durch Metyrapon bei 3-MC-induzierten Mikrosomen.

Bei den Hydrazone B₁ - B₃ führen die drei Hemmstoffe (CO, SKF 525-A, Metyrapon) bei unbehandelten Tieren zu einer partiellen Hemmung. Die durch CO und SKF bei der Kontrolle erzielte Hemmrate wird auch bei PB-induzierten Mikrosomen gefunden. Im Gegensatz dazu ergibt sich unter dem Einfluß von Metyrapon ein Unterschied bezüglich der Hemmrate bei B₁ bzw. B₂ und B₃. Während bei B₁ eine der Kontrolle analoge Hemmung gefunden wird, übt Metyrapon bei B₂ keine Inhibition aus und bewirkt bei B₃ sogar einen leichten Anstieg. Die Hemmung der N-Demethylierung bei 3-MC-induzierten Mikrosomen fällt bei B₁ - B₃ durch CO und SKF geringer aus als bei der Kontrolle und den PB-induzierten Mikrosomen. Auch hier bildet Metyrapon eine Ausnahme. Während bei B₁ der durch 3-MC-Induktion erreichte Anstieg durch Metyrapon aufgehoben wird, läßt sich bei B₂ und B₃ eine Steigerung finden.

6. Beeinflussung der mikrosomalen N-Demethylierung durch Thioglykolsäure

Sulphydrylgruppen haben für die Funktion des Enzymproteins der gemischfunktionellen Oxydasen eine besondere Bedeutung. Auch wenn es sich hierbei nicht um ein sogenanntes SH-Enzym handelt, konnten NETTER und JENNER, 1966, eine eindeutige Hemmwirkung auf die O- und N-Demethylase aromatischer Nitroverbindungen durch Blockierung der SH-Gruppen mit p-Chloromercuribenzoat feststellen. Arbeiten über die Struktur des Cytochrom P 450, isoliert aus dem Bakterium *Pseudomonas putida* (P 450_{cam}) und aus induzierten Kaninchenlebermikrosomen (P 450_{LM}) bestätigten, daß beide Proteine sechs Cysteinbausteine enthalten (DUS et al., 1970 und 1974). Zumindest für das Cytochrom P 450_{cam} kennt man die wichtige Funktion der freien SH-Gruppen für die Bindung des prothetischen Eisens und des Substrates.

Wie die Ergebnisse im ersten Teil der Arbeit gezeigt haben, handelt es sich bei den zu untersuchenden Substanzen um Verbindungen mit geringer desaktivierender Wirkung bei SH-Enzymen. In diesem Zusammenhang war es interessant zu wissen, ob die N-Demethylierung der β -Chloräthylhydrazinderivate im mikrosomalen System durch zusätzliche SH-Gruppen beeinflussbar ist, um gegebenenfalls Anhaltspunkte für eine Eigenhemmung der Metabolisierung durch Bindung an Cytochrom P 450 ständige SH-Gruppen zu finden. Durch Zugabe von Thioglykolsäure wurde

ein unphysiologisch hoher SH-Spiegel erreicht. Cystein konnte hierfür nicht verwendet werden, da seine freie NH_2 -Gruppe nach Sörensen mit dem gebildeten Formaldehyd reagiert. Um eine Hemmwirkung der Thioglykolsäure selbst auszuschließen, wurde zum Vergleich die N-Demethylierung von Aminopyrin bei Gegenwart von Thioglykolsäure mituntersucht. Die verwandten Rattenlebermikrosomen waren PB-induziert und enthielten pro Probe 1 μMol Thioglykolsäure.

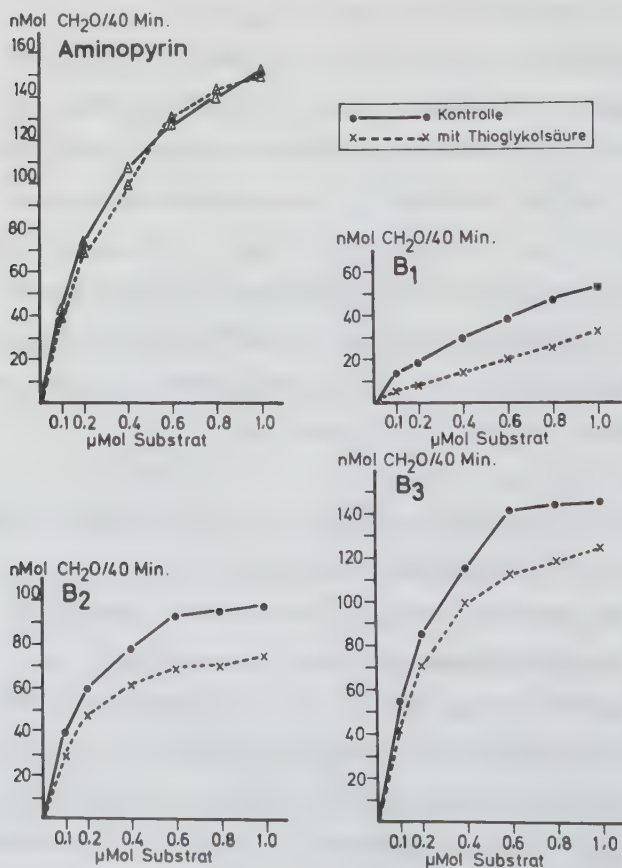


Abb. 12: Formaldehydbildung durch Mikrosomen von PB-induzierten Rattenlebern aus Aminopyrin und den Subst. B₁, B₂ und B₃ nach Thioglykolsäurezusatz (1 μMol /Ansatz)

Wie die Diagramme in Abb. 12 zeigen, wird die Demethylierung der alkylierenden Substanzen B_1 , B_2 und B_3 durch die zugefügten SH-Gruppen deutlich gehemmt.

Die N-Demethylierung des Aminopyrins bleibt unbeeinflusst.

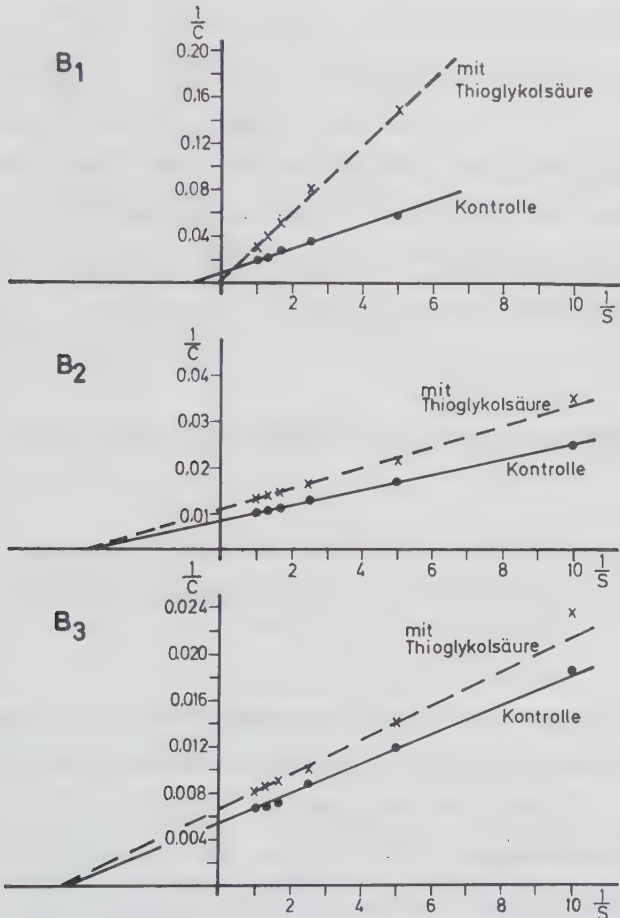


Abb. 13: Reziproke Wiedergabe der Hemmung der mikrosomalen N-Demethylierung durch Thioglykolsäure

B₂ und B₃ werden nicht kompetitiv gehemmt (Abb. 13). Das Substrat wird verzögert metabolisiert. Möglicherweise ist der Oxidationsprozeß durch eine Verbindung der Substanzen mit der Thioglykolsäure sterisch behindert. Bei Subst. B₁ kommt es zu einer unspezifischen Hemmung.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Subst. B₁, B₂ und B₃ bei der Metabolisierung am mikrosomalen System eine Eigenhemmung ausüben, indem sie funktionelle SH-Gruppen besetzen, damit sich selbst der Umsetzung entziehen und darüber hinaus das Enzym inaktivieren. Hierdurch sollte die Funktionsfähigkeit der Leber zumindest vorübergehend gestört sein.

III. Untersuchungen zur Leberaktivität nach Applikation von B₁- in vivo

1. Aktivität der mischfunktionellen Oxidasen beim Umsatz von Anilin, p-Nitroanisol, Subst. B₁ und Aminopyrin nach Gabe von Subst. B₁

Nach den Untersuchungen zur in vitro Metabolisierung der β -Chloräthylhydrazinderivate durch Rattenlebermikrosomen interessierte im Hinblick auf die praktische Anwendung der Substanzen auch die Wirkung auf die Leberenzymaktivität in vivo. Das Hydrazon B₁ wurde stellvertretend für die folgenden Versuche ausgewählt, weil es die bisher interessanteste Substanz aus der Untersuchungsreihe darstellt.

150 g schweren Ratten wurde 400 mg B_1 /kg i.p. appliziert. 2, 4, 8, 24 und 48 Stunden nach Verabreichung wurden jeweils drei Tiere getötet und nach B.II.11. aufgearbeitet. Als Maß für die Aktivität der gemischtfunktionellen Oxidasen diente die zeitabhängige Veränderung des Gehaltes an Cytochrom P 450 und der Umsatz einiger Modellssubstrate in vitro.

Tab. 15: Zeitabhängige Aktivität mischfunktioneller Oxidasen der Rattenleber nach einmaliger B_1 -Dosis (400 mg/kg)

Std.	nMol Cyto- chrom P 450 mg Protein	nMol CH_2O 1 μ Mol Aminopyrin	nMol CH_2O 1 μ Mol Subst. B_1	p-Hydroxy- anilin $\frac{E_o}{E_t} \cdot 100$ 1 μ Mol Anilin	p-Nitrophenol $\frac{E_o}{E_t} \cdot 100$ 1 μ Mol 4- Nitroanisol
0	0,66 100 %	122,5 100%	83,3 100%	100 %	100 %
2	0,55 83 %	64,3 52%	56,8 68%	47 %	72 %
4	0,44 67 %	40,3 33%	46,0 55%	32 %	63 %
8	0,46 70 %	61,5 50%	73,8 89 %	44 %	69 %
24	0,52 79 %	84,3 69%	84,5 102 %	101 %	113 %
48	0,64 97 %	114,8 94%	84,5 102 %	190 %	174 %

Tab. 15 und Abb. 14 fassen die Ergebnisse zusammen. Beim Aminopyrin findet man bereits 2 Std. nach Applikation von B_1 eine Reduzierung der N-Demethylierung um 48 %. Die Hemmung hat ihr Maximum nach 4 Stunden mit 67 % erreicht. Ein Wiederanstieg der Enzymaktivität ist bereits nach 8 Stunden festzustellen und nach 48 Stunden wird die Kontrolle wieder erreicht. Der Abfall des Cytochrom P 450-Gehaltes verläuft zeitlich parallel

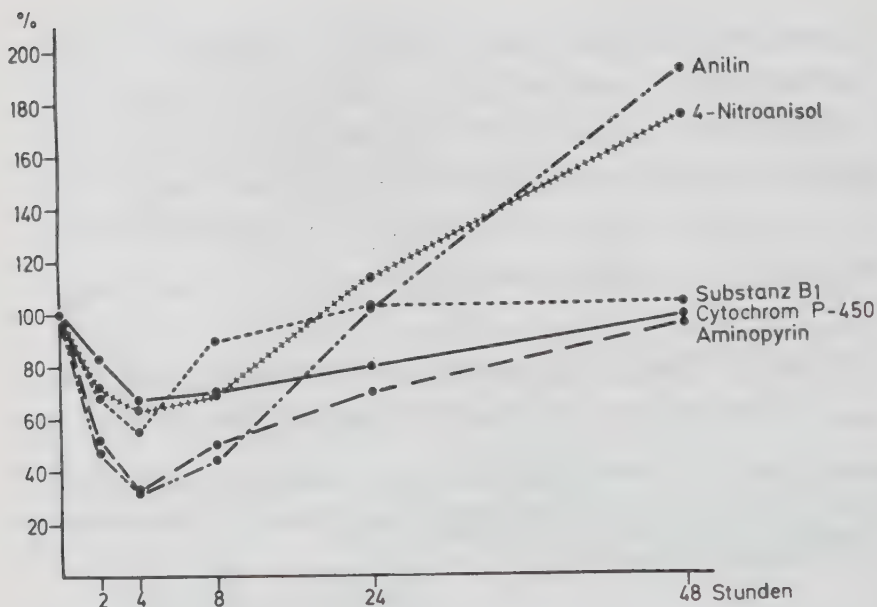


Abb. 14: Zeitabhängige Aktivität mischfunktioneller Oxidasen der Rattenleber nach einmaliger B_1 -Dosis (400 mg/kg) bezogen auf Kontrolle = 100 %

der Hemmung der N-Demethylierung des Aminopyrins, fällt jedoch mit 33 % nach 4 Stunden geringer aus. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit den Untersuchungen von LEE und LUCIER, 1976, die bei Mäuselebermikrosomen nach Vorbehandlung mit 400 mg Procarbazin (Subst. C) gleiche Resultate erhielten.

Die N-Demethylierung von Hydrazon (B_1) wird ebenfalls bis zu 45 % gehemmt. Bereits nach 24 Stunden ist die volle Enzymaktivität wiederhergestellt.

Auch die Anilinhydroxylierung wird sehr stark beeinträchtigt.

Die größte Hemmwirkung ist nach 4 Stunden mit 68 % festzustellen. Nach 24 Stunden entsprechen die Werte wieder der Kontrolle, um nach 48 Stunden sogar auf 190 % anzusteigen.

Einen ähnlichen Verlauf weist die O-Demethylierung des 4-Nitroanisols auf. Hier steigt die Metabolisierung nach 48 Std. auf 174 % der Kontrolle. Die Hemmung der O-Demethylase ist jedoch geringer als die N-Demethylase. Sie erreicht ebenfalls nach 4 Std. ihre höchsten Werte mit 37 %.

Die Ergebnisse zeigen am Beispiel der vier Substrate, daß nach einmaliger Gabe einer subtoxischen Dosis von 400 mg/kg B₁ die mischfunktionellen Oxidasen der Leber zwar vorübergehend gehemmt sind, es dann aber substratspezifisch zu einer Aktivitätssteigerung kommen kann. Ähnliche Ergebnisse sind schon aus der Literatur bekannt (ANDERS, 1971 und BERAUD, 1975).

Tab. 16: Zeitabhängige relative Cytochrom P 450-Aktivität gegenüber verschiedenen Substraten

Zeit nach Hydrazon-Gabe	Aminopyrin	Hydrazon	Anilin	4-Nitroanisol
0 Std.	1,0	1,0	1,0	1,0
2 Std.	0,63	0,82	0,56	0,87
4 Std.	0,49	0,83	0,47	0,94
8 Std.	0,72	1,27	0,63	0,98
24 Std.	0,87	1,28	1,27	1,43
48 Std.	0,97	1,05	1,96	1,79

Das Verhältnis

$$\frac{\text{Substratmetabolisierung in \%}}{\text{Cytochrom P 450-Gehalt in \%}} = \text{rel. Cytochrom P 450-Aktivität}$$

gibt Aufschluß über die zeitabhängige P 450-Aktivität für die jeweiligen Substrate.

Die Aktivität des Cytochrom P 450 für das Aminopyrin wird nachhaltig durch Subst. B₁ gehemmt und sinkt bis auf 49 % ab. Sie erreicht erst wieder nach 48 Stunden den Ausgangswert. Die Minderung liegt bei der Anilinhydroxylierung ebenfalls bei 50 %, regeneriert sich jedoch bereits nach 24 Std. und zeigt dann eine Aktivitätssteigerung. Dieser Effekt wird auch bei der Demethylierung vom Hydrazon B₁ und 4-Nitroanisol sichtbar. Für beide Substanzen ist die relative Aktivität des Cytochrom P 450 jedoch nur für 4 Std. geringfügig gehemmt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Tabellen 15 und 16 so stellt man fest, daß nach einem Rückgang des Cytochrom P 450-Gehaltes und seiner relativen Aktivität zunächst die Umsatzrate der jeweiligen Substrate wieder steigt und sogar die Ausgangswerte klar übertrifft, bevor der Gehalt an Cytochrom P 450 den Ausgangswert wieder erreicht hat. Hierdurch kommt es zu dem beobachteten Reboundeffekt, der beim Hydrazon innerhalb von 2 Tagen abgeklungen ist.

Neben der einmalig hohen subtoxischen Dosis (400 mg/kg) interessierte auch die Beeinflussung der Leberaktivität nach mehrfach niedrigerer Substanzgabe, um eventuell kummulative Effekte zu erfassen. Daher wurde die Enzymaktivität von Lebermikrosomen nach i.p. Applikation von 200 mg/kg Hydrazon B₁ an drei aufeinanderfolgenden

den Tagen untersucht. Am 4. Tag wurden die Tiere getötet und die entnommenen Lebern entsprechend aufgearbeitet.

Tab. 17: Cytochrom P 450-Gehalt der Rattenleber und Metabolisierung verschiedener Substrate nach i.p.Injektion von 200 mg/kg · 3 Tage (Ergebnisse in Prozent der Kontrolle)

Cytochrom P 450	Aminopyrin	Subst. B ₁	Anilin	4-Nitroanisol
80 %	38 %	103 %	137 %	110 %

Unter diesem Dosierungsschema sinkt der Gehalt des Cytochrom P 450 auf 80 % ab. Während die Demethylierung vom Hydrazon B₁ (103 %) und vom 4-Nitroanisol (110 %) praktisch unbeeinflusst bleibt, ist die Anilinhydroxylierung um 37 % erhöht. Die Aminopyrindemethylierung dagegen zeigt eine 62 %ige Hemmung. Vergleicht man diese Ergebnisse mit dem 24 Std.-Wert der einmaligen Dosierung (Tab. 16), so stimmen der Gehalt an Cytochrom P 450 sowie Hydrazon B₁- und 4-Nitroanisolmetabolisierung überein. Die Anilinhydroxylierung ist unter dreimaliger Dosierung gesteigert. Nur die Hemmung der Aminopyrindemethylierung führt unter wiederholter Gabe von Subst. B₁ zur Kummulation dieses Pharmakons.

2. Beeinflussung der Hexobarbital-Schlafzeit durch Substanz B₁

Die Beeinflussung der Hexobarbital-Schlafzeit durch Pharmaka kann grundsätzlich auf zwei verschiedenen Wegen, getrennt oder gemeinsam, erfolgen. So kann z. B. eine Schlafzeitverlängerung bedingt sein durch einen narkotischen Eigeneffekt des Pharmakons oder auch durch eine Verzögerung des Barbituratabbaus. Von hydrazinhaltigen MAO-Hemmern sind Verlängerungen der Barbituratnarkose beschrieben worden (LA ROCHE et al., 1960). Wie KATO et al., 1969, fanden, greifen solche MAO-Hemmer inhibierend in den Metabolismus von Barbituraten und auch z. B. Aminopyrin ein. Auch Procarbazin (Subst. C) verlängert die Hexobarbitalschlafzeit und hemmt die Aminopyrin-N-Demethylase (EADE et al., 1972). Während aus diesen Ergebnissen auf eine Hemmung des Barbituratabbaus geschlossen werden kann, konnten jüngst auch LEE und LUCIER, 1976, bei Subst. C in hoher Dosierung eine narkotische Eigenwirkung nachweisen. Es stellte sich daher die Frage, ob auch das Hydrazon B₁, das im Gegensatz zu den erwähnten MAO-Hemmern und auch dem Procarbazin (Subst. C) kein direktes Alkylhydrazin darstellt, eine Verlängerung der Hexobarbitalschlafzeit erzeugt, da "Azo-Procarbazin", das als ein tautomeres Hydrazon betrachtet werden kann, keinen Einfluß auf die Hexobarbitalnarkose der Maus besitzt (LEE und LUCIER, 1976).

Nach C.III.1. erreicht die Hemmung der mikrosomalen Aktivität 4 Std. nach Gabe von Subst. B₁ ihr Maximum, was zum Anlaß genommen wurde, die durch 100 mg/kg Hexobarbital erzeugte Narkose bei Ratten 4 Std. nach Gabe von Subst. B₁ zu bestimmen.

Tab. 18: Schlafzeit bei Ratten unter dem Einfluß von Subst. B₁ mit und ohne Hexobarbitalgabe

⁺Wert für 7 von 10 Tieren, 3 Tiere blieben ohne Narkose

		mg Subst. B ₁ /kg					
		C	50	100	200	400	600
Schlafzeit (min)	kein Hexobarbital	-	0	0	0	0	26,7 ⁺
	100 mg Hexobar. kg	26,3±2,6	34,6±4,3 p<0.025	37,5±5,4 p<0.01	69,8±8,6 p<0.0025	121,3±13,2 p<0.0025	237±53,7 p<0.0005

Wie aus Tab. 18 und Abb. 15 hervorgeht, vermag Subst. B₁ die Hexobarbitalschlafzeit dosisabhängig zu verlängern. Nur bei der bereits toxischen Gabe von 600 mg/kg zeigte sich bei sieben von zehn Tieren eine geringe narkotische Eigenwirkung.

Wie bei Versuchen unter C.II.5. festgestellt wurde, wird die N-Demethylierung von Subst. B₁ durch SKF gehemmt, durch 3-MC gesteigert und bleibt durch PB unbeeinflusst. Daher wurde auch der Einfluß von Subst. B₁ auf die Schlafzeit bei Ratten untersucht, die mit diesem Hemmstoff bzw. Induktor vorbehandelt waren.

Dabei fand sich nach Induktion mit 3-MC und nach Gabe von B₁ eine deutliche Schlafzeitverkürzung gegenüber nicht induzierten Tieren. Auf die Hexobarbitalschlafzeit blieb die Induktion allein ohne Einfluß.

Nach SKF-Vorbehandlung wurde dagegen die Schlafzeit unter Subst. B₁

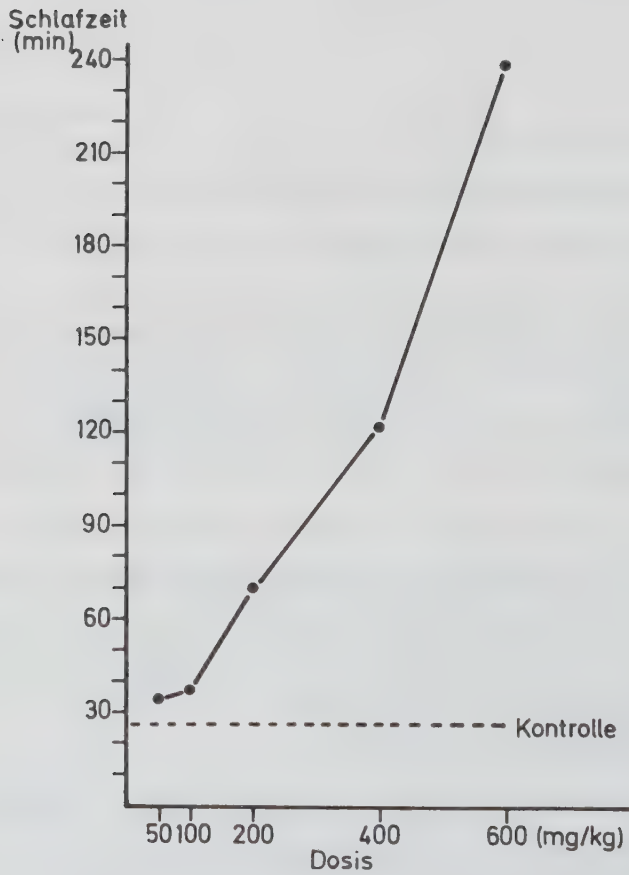


Abb. 15: Hexobarbitalschlafzeit in Abhängigkeit von der Dosierung der Subst. B₁

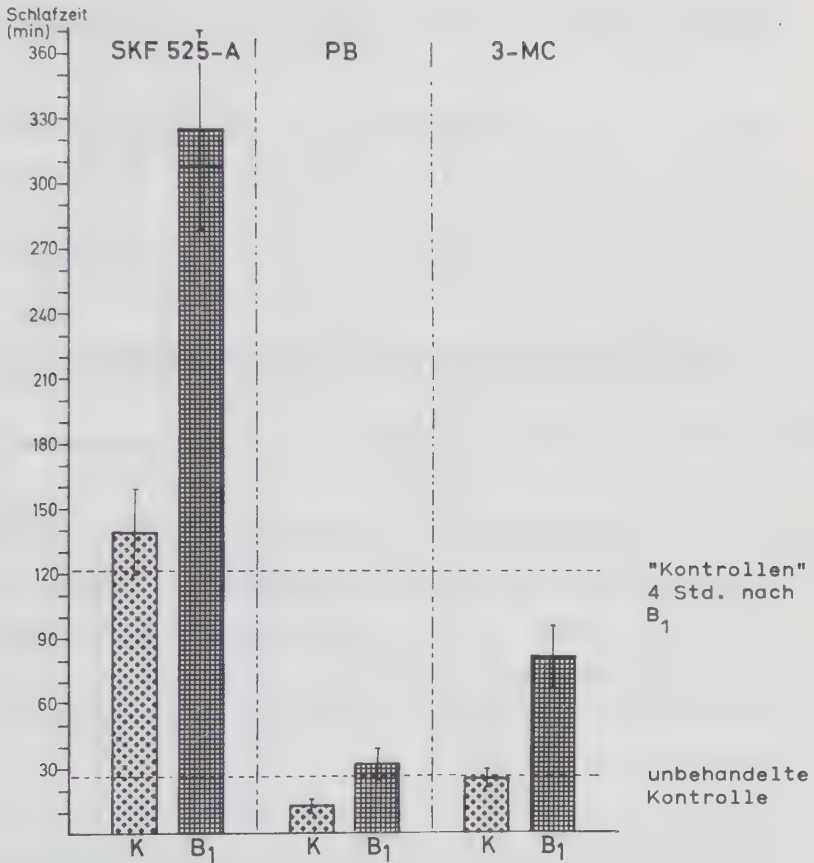


Abb. 16: Einfluß eines Inhibitors und von zwei Induktoren auf die Schlafzeit von Ratten nach i.p.Gabe von 100 mg/kg Hexobarbital 4 Std. nach i.p.Applikation von 400 mg/kg Subst. B₁. (SKF = 25 mg/kg i.p. 30 min vor Subst. B₁; PB = 3 x 100 mg/kg . die i.p.; 3-MC = 3 x 20 mg/kg . die i.p.)
K = Schlafzeit nach Vorbehandlung mit den angegebenen Substanzen; B₁ = Schlafzeit nach Vorbehandlung und B₁-Gabe

enorm verlängert. Allerdings nahmen die Kontrollwerte ebenfalls zu.

Umgekehrte Verhältnisse findet man nach PB-Induktion. Hier wird sowohl die Schlafzeit unter Subst. B_1 als auch die nur unter Hexobarbital deutlich verkürzt.

IV. Metabolische Mikrosomenaktivität der Meerschweinchenleber

PROUGH et al., 1970, untersuchten die N-Methylhydrazindemethylase bei verschiedenen Tierspezies. Nach ihren Erkenntnissen besitzt das Meerschweinchen für das einfache Methylhydrazin nur eine sehr geringe N-Methylhydrazindemethylase-Aktivität. Da es auch als Versuchstier für die pharmakologische Prüfung der untersuchten Substanzen eingesetzt wurde, war es wichtig zu wissen, inwieweit unsere Substanzen von Lebermikrosomen des Meerschweinchens demethyliert werden.

Aus diesem Grunde wurde die Aktivität von Meerschweinchenlebermikrosomen bezüglich der einzelnen Substanzen entsprechend den Rattenmikrosomen bestimmt.

Für die Substanzen A_1 , C und B_1 zeigt die Ratte eine wesentlich stärkere N-Methylhydrazin-Demethylase-Aktivität, während bei B_2 und B_3 das Meerschweinchen eine höhere Umsatzquote aufweist, die sich bei der Substanz B_3 annähernd verdoppelt. Daraus ist zu schließen, daß bei Mikrosomen der Meerschweinchenleber die O- und N-Demethylierung am Kern gegenüber der N-Methylhydrazindemethylierung bevorzugt ist.

Tab. 19: Vergleich zwischen der Formaldehydbildung aus verschiedenen N-Methylhydrazinderivaten durch Lebermikrosomen des Meerschweinchens und der Ratte in n Mol CH_2O /5 mg Protein x 40 min

a = Meerschweinchenlebermikrosomen

b = Rattenlebermikrosomen

	n Mol Cytochrom P 450/mg Protein	Subst. A1 nMol CH_2O	Subst. C nMol CH_2O	Subst.B ₁ nMol CH_2O	Subst.B ₂ nMol CH_2O	Subst.B ₃ nMol CH_2O
a	C,77	1,3	7,5	36,8	159,5	303,5
b	C,83	15,C	20,C	52,5	103,0	164,C

Es sind also auch bei unseren Substanzen Speziesunterschiede festzustellen. Setzt man voraus, daß nur das vollständige Molekül eine Wirkung hat und jede Metabolisierung einer Inaktivierung gleichkommt, so haben diese Speziesunterschiede Folgen für die therapeutische Anwendung im Tierversuch.

V. Metabolische Mikrosomenaktivität der Ehrlich-Ascitescarzinomzellen der Maus

BRAUN et al., 1976, untersuchten die Wirkung von β -chlorierten Methylhydrazinen auf Ehrlich-Ascitescarzinomzellen in vitro und konnten durch diese Substanzen eine eindrucksvolle Hemmung der DNS-, RNS- und Proteinsynthese sowie der Nukleosidphosphorylierung feststellen. Die Frage, ob diese Wirkung dem Gesamtmolekül oder aber auch seinen demethylierten Metaboliten beizumessen ist, konnte bisher nicht geklärt werden.

So stellten wir eine Mikrosomenfraktion von Ehrlich-Asciteszellen her (B.II.18), die wir wie die Rattenlebermikrosomen auf ihre N-demethylierende Aktivität untersuchten. Es stellte sich heraus, daß aus keiner der untersuchten Substanzen A_1 , C und B_1 Formaldehyd durch das mikrosomale System der Asciteszellen gebildet wurde. Da, wie unter B.II.18. beschrieben, der Aufschluß der Zellen nur mit Ultraschall zu erreichen war, unterwarfen wir Leberzellen dem gleichen Prozeß, um eine Inaktivierung der Mikrosomenaktivität durch die Beschallung auszuschließen. Die Lebermikrosomenaktivität blieb erhalten.

Aus diesem Versuch muß gefolgert werden, daß in vitro die intakte Struktur der Prüfsubstanz die Wirkung entfaltet.

VI. Adsorptive Bindung der Subst. A_1 an die Hefezellwand

BRAUN et al., 1976, sowie BRAUN und LANGE, 1976, studierten die Wirkung der Substanzen A_1 und B_1 auf Hefezellen (*Sacch. cerevisiae*). Dabei fanden sie, daß das Zellwachstum gehemmt und die Vermehrung fast vollständig unterdrückt wurde. Auffallend waren starke mikroskopisch sichtbare Veränderungen der Zellwand. Es stellte sich daher die Frage, ob diese Erscheinung durch eine direkte Reaktion der Substanzen mit der Zellwand bedingt ist oder als Folge einer allgemein zellulären Schädigung angesehen werden muß. Es wurde daher die Reaktion von Subst. A_1 mit ruhenden Hefezellen in nährstoffreier Suspension untersucht.

Für eine mögliche Bindung des Hydrazins (A_1) an die Hefezellwand stehen zwei Angriffspunkte zur Verfügung. Zum einen kann sich das in der Aziridiniumform vorliegende Hydrazin (A_1) als Kation an die anionisch geladenen, für die Permeation wichtigen Stellen der Zellwand durch Verdrängung von Calcium anlagern (SIEBOLD, 1961), zum anderen könnte es aufgrund seiner alkylierenden Eigenschaften mit Mercaptogruppen und den zahlreich vorhandenen Disulfidbrücken der Zellmembran eine Reaktion eingehen. Diese Disulfide spielen eine wichtige Rolle bei der Zellsprossung (BROWN und HOUGH, 1966, NICKERSON und FALCONE, 1956).

Tab. 20: Adsorption von Subst. A_1 an die Hefezellwand

Adsorption Kontrolle	mit CaCl_2 abspülbar	mit Aq. bidest. abspülbar
$5,8 \pm 0,5 \%$	$5,8 \pm 0,2 \%$	$4,9 \pm 0,3 \%$

Nach Tab. 20 werden von den Hefezellen unter den beschriebenen Bedingungen 5,8 % adsorptiv gebunden, was etwa 10^9 Molekülen pro Hefezelle entspricht. Durch Waschen der Hefe mit 2 %iger CaCl_2 -Lösung ließen sich alle Moleküle wieder ablösen. Etwas geringer ist die Auswaschung mit Aq. bidest. Hieraus geht hervor, daß der größere Teil der gebundenen Subst. A_1 unspezifisch adsorbiert und durch Waschen mit Wasser abgespült werden kann. Jedoch etwa ein Prozent muß ionogen gebunden sein, da dieses Quantum nur mit CaCl_2 -Lösung wieder abgelöst wird. Diese Menge entspricht etwa 10^7 Molekülen pro Zelle. Wie dieser Versuch zeigt, wird Subst. A_1 nicht nachweisbar kovalent als Folge eines Alkylierungsprozesses gebunden.

Dieses Ergebnis läßt sich natürlich nicht uneingeschränkt auf wachsende Hefe übertragen, da im Zustand der Sprossung die Zellwand einem ständigen Strukturwechsel unterliegt und so einen besseren Angriffspunkt für eine Alkylierung bietet.

VII. Umsatz der Subst. A_1 im Wachstumsversuch mit unsynchronisierten Hefezellen

Wie BRAUN et al., 1976, feststellten, werden gerade unsynchron wachsende Hefezellen in Abhängigkeit von der Hydrazinkonzentration (A_1) in ihrer Vermehrung behindert. Nach dieser Feststellung und der Beobachtung einer adsorptiven Bindung des Hydrazins an die Hefezelle soll der Substanzverbrauch während eines Wachstumsversuches untersucht werden. Daher wurden zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstumsversuchs Proben entnommen und mit Hilfe der im ersten Teil erarbeiteten analytischen Methoden die noch nachzuweisenden Substanzmengen bestimmt. Gleichzeitig durchgeführte Blindversuche studieren den Einfluß von Glukose und Nährmedium auf die Nachweismethoden.

Wie aus der Abb. 17 und Tab. 20a u.b hervorgeht, beweisen die Versuche ohne Hefe und ohne Glukose sowie mit Hefe, aber ohne Glukose, die Stabilität des Hydrazins (A_1) über die gesamte Versuchszeit. Im Medium mit und ohne Hefezellen können schon nach 15 min nur noch 75 % des Ausgangswertes der alkylierenden Funktion bestimmt werden. Kurve a und b fallen bis zur 240. Minute gleichmäßig ab. Erst zwischen der 240. und 480. Minute

Tab. 20a: Zeitabhängiger Verlust der alkylierenden Aktivität von Subst. A₁ unter verschiedenen Medium-Bedingungen (s. Methodik, B.II.1.1.2.)

Alkylierende Funktion in					
Min.	15	60	120	240	480
Medium + Hefe + Glukose	107,6 74,7 %	106,5 74 %	104,4 72,5 %	92,1 64,6 %	55,3 38,4 %
Medium - Hefe + Glukose	108,6 75,4 %	105,8 73,4 %	104,7 72,7 %	94,5 65,6 %	78,5 54,5 %
Medium + Hefe - Glukose	140,4 97,4 %	142 98,6 %	143 99,3 %	143 99,3 %	137,2 95,3 %
Medium - Hefe - Glukose	144,2 100 %	145,4 101 %	142,2 96 %	146,8 102 %	141 98 %

Tab. 20b: Abnahme des Nachweises der freien NH₂-Gruppe von Subst. A₁ unter verschiedenen Medium-Bedingungen (s. B.II.1.2.2.)

Freie NH ₂ -Gruppe in					
Min.	15	60	120	240	480
Medium + Hefe + Glukose	121,0 84 %	115,7 80,3 %	112,0 78,0 %	101,0 70,4 %	79,3 55,1 %
Medium - Hefe + Glukose	118 82 %	119 83 %	115 80 %	117 81 %	117 81 %
Medium + Hefe - Glukose	147 102 %	150 104 %	145 100,6 %	152 105,5 %	155 107,6 %
Medium - Hefe - Glukose	145,5 101 %	145 101 %	147 102 %	148 103 %	156 108 %

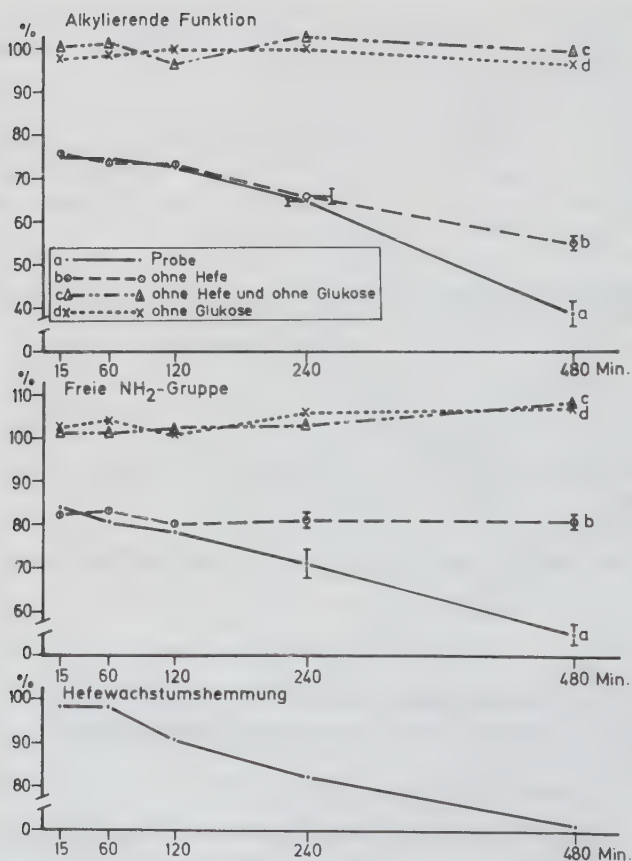


Abb.17: Zeitabhängiger Verlust der alkylierenden Aktivität bzw. des Nachweises der freien NH₂-Gruppe von Substanz A₁ unter verschiedenen Medium-Bedingungen
 $p < 0,25$ für den 240 Minutenwert der alkylierenden Funktion der Kurven a u. b; $p < 0,0005$ für den 480 Minutenwert der alkylierenden Funktion der Kurve a u. b; $p < 0,0025$ für den 240 Minutenwert der freien NH₂-Gruppe der Kurven a u. b; $p < 0,0005$ für den 480 Minutenwert der freien NH₂-Gruppe der Kurven a u. b

tritt eine Differenz auf. Unter den gleichen Bedingungen ist die freie NH₂-Gruppe nach 15 min nur noch zwischen 80 % und 85 % nachweisbar. Hier bleibt jedoch der Gehalt ohne Hefezusatz über die gesamte Versuchszeit konstant, während mit Hefezusatz schon

nach 60 bis 120 min ein geringfügiger Abfall zu verzeichnen ist, der nach 240 min auf 10,5 % und nach 480 min auf 26 % angestiegen ist.

Es fällt auf, daß der Nachweis beider funktionellen Gruppen in Gegenwart von Glukose und Abwesenheit von Hefezellen zu 25 % bzw. 15 % niedriger ausfällt als im Nährmedium ohne Glukose-zusatz. Dieser Abfall nimmt beim Nachweis der alkylierenden Funktion zeitabhängig zu, bleibt aber beim Nachweis der freien NH_2 -Gruppen konstant. Es ist daher anzunehmen, daß es zwischen Subst. A_1 und Glukose zu einer bisher nicht näher untersuchten Reaktion kommt. Als Substratverbrauch kann daher nur die Differenz im Vollmedium mit und ohne Hefe betrachtet werden.

Formaldehyd konnte nicht in meßbaren Konzentrationen aus den entnommenen Proben bestimmt werden. Sollte es dennoch unter den Versuchsbedingungen zu einer CH_2O -Abspaltung kommen, so ist zu diskutieren, ob es nicht sogleich im C_1 -Pool der Hefezellen metabolisiert wird.

D. DISKUSSION

=====

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst etwas über das chemische Verhalten von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin (A_1) sowie seiner Benzaldehydhydrazonderivate (B_{1-3}) zu erfahren. Vom strukturellen Aufbau her handelt es sich um Substanzen, die mit den Lostverbindungen verwandt sind, weshalb zunächst ihr alkylierendes Verhalten untersucht wurde. Dabei zeigte es sich, daß diese Substanzen in der Lage sind, 4-Nitrobenzylpyridin (NBP) zu alkylieren. Im Gegensatz zu Lostabkömmlingen vermögen sie auch ähnlich den Äthyleniminen, mit NBP-Perchlorat zu reagieren. Während bei den Äthyleniminen für dieses Reaktionsverhalten eine Deprotonierung des NBP-Perchlorat durch den Reaktanten erforderlich ist, wodurch das Äthylenimin in eine reaktive Carbeniumstruktur überführt wird, können die N-Methylhydrazinderivate durch Protonierung nicht in eine reaktive Form überführt werden, die zu einer Reaktion durch die β -Chloräthylgruppe führt. Bedingung für eine Reaktion an der N- β -Chloräthylgruppe ist die vorherige Bildung eines Aziridiniums, dessen Bildung durch Protonierung am Stickstoff verhindert wird. Aus diesem Grunde reagiert N-Dimethyl-N- β -chloräthylamin mit NBP, aber nicht mit NBP-Perchlorat, wie entsprechende Versuche zeigten. PREUSSMAN et al., 1969, fanden, daß einfache Alkylhydrazone mit NBP-Perchlorat, aber nicht mit NBP reagieren. Sie erklären diese Reaktion mit einer Protonierung des Hydrazons am N²-Stickstoff (Alkylstickstoff) und der additiven Anlagerung des NBP an die durch Protonenanlagerung aktivierte C-N-Doppelbindung. Eine solche Additionsreaktion ist jedoch bei der freien Hydrazinver-

bindung (Subst. A_1) ausgeschlossen. Für die Reaktion der N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazone mit NBP-Perchlorat sind daher grundsätzlich zwei Mechanismen zu diskutieren. Entweder kommt es zu einer gemischten Reaktion, d.h. NBP-Perchlorat wird in einem Gleichgewicht durch die Hydrazonverbindungen deprotoniert und reagiert mit nicht protonierten β -Chloräthylhydrazonen oder die quartären N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazone sind in der Lage zu alkylieren. Dies ist aber nur in Form einer Methylgruppenübertragung denkbar.

Während diese Alkylierung im nicht physiologischen Medium unter erhöhter Temperatur abläuft, wurden auch Hinweise für ein alkylierendes Verhalten im biologischen Medium gesucht. Dabei fand sich eine zeitabhängige Hemmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die bei Subst. A_1 stärker ausgebildet war als bei ihrem einfachen Hydrazon B_1 . Die nur schwache Hemmung der Enzymaktivität unter Subst. B_1 konnte durch Einfügen eines Kernsubstituenten, der eine Erhöhung der Nukleophilität am N^2 -Stickstoff verursacht, erheblich gesteigert werden. Dieser Effekt weist auf eine intermediäre Ausbildung der Aziridiniumstruktur hin, deren Bildungstendenz in starkem Maße von der Nukleophilität des N^2 -Stickstoffes abhängt.

Gegen ein starkes Alkylierungsvermögen der Subst. A_1 im biologischen Medium spricht ihr Reaktionsverhalten an der Hefezellwand. Es konnte nur eine ionogene, nicht jedoch eine kovalente Bindung nachgewiesen werden.

Einen weiteren wichtigen Aspekt bei der Beurteilung von Methylhydrazinen stellt ihr Redoxverhalten dar. Hydrazine sind allgemein leicht zu oxidieren, wobei aus Monomethylhydrazinderivaten in einem der Oxidation nachfolgenden Schritt die Methylgruppe selbst unter physiologischen Bedingungen (WEITZEL et al., 1967) in Form von Formaldehyd abgespalten wird. Mit Hilfe des Redoxindikators 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na (Tillman's Reagenz) konnte die Subst. A_1 wohl oxidiert werden, eine nachfolgende Formaldehydbildung blieb jedoch aus. Bei einer Oxidation von Subst. A_1 mit Jod werden zwei Äquivalente Jod verbraucht. Anders verhält sich Subst. A_1 unter dem Einfluß von NADP regenerierendem System. Hierbei entstehen aus dem Methylhydrazin (A_1) erhebliche Mengen Formaldehyd. Offensichtlich läuft in diesem System die Oxidation über andere Zwischenstufen, die zur Abspaltung der Methylgruppe in Form von CH_2O befähigt sind. Bei Gegenwart von einem NADP regenerierenden System ist an eine Hydridionenabspaltung aus dem Substrat zu denken.

Auch bei der mikrosomalen N-Demethylierung ergeben sich interessante Unterschiede zwischen Procarbazin (Subst. C) und den Methylhydrazonen. Es wird bei den Hydrazonen eine erheblich höhere Demethylierungsrate vorgefunden, die im Gegensatz zur Substanz C nicht durch Phenobarbital (PB) induzierbar ist. Nach 3-Methylcholanthren (3-MC)-Induktion dagegen steigt sie bei den Hydrazonen B_{1-3} stärker als bei Subst. C an.

Daß die N-Demethylierung bei den Hydrazonen B_{1-3} von einer PB-Induktion unbeeinflußt bleibt, geht auch aus Hemmversuchen mit Kohlenmonoxid und SKF 525-A hervor. Während beim Procarbazin die durch Induktion erzielte Steigerung komplett gehemmt wird, ist bei den Hydrazonen $B_1 - B_3$ eine der Kontrolle vergleichbare Hemmrate festzustellen. Unter dem Einfluß von Metyrapon verhalten sich die N-Demethylierungen der Hydrazone B_{1-3} unterschiedlich. Bei nicht induzierten Lebern wird bei allen drei Hydrazonen die Demethylierung nur geringfügig gehemmt, wohingegen dies bei PB-induzierten Mikrosomen allein bei Subst. B_1 der Fall ist. Bei den kernsubstituierten Hydrazonen B_2 und B_3 dagegen wird keine Hemmung (B_2) bzw. eine Steigerung (B_3) erzielt. Dies könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung an der Demethylierung der kernständigen O- u. N-Methylgruppen sein oder zumindest bei Subst. B_3 der Ausdruck eines "enhancement" (LEIBMAN, 1969). Nach 3-MC-Induktion fällt die Hemmung durch Kohlenmonoxid und SKF 525-A gegenüber der Kontrolle und der PB-Induktion geringer aus. Eine Ausnahme bildet auch hier wieder die Hemmung unter Metyrapon. Während bei Subst. B_1 noch ein gewisser Hemmeffekt in Höhe der durch 3-MC erzielten Induktion erreicht wird, wird bei den Substanzen B_2 und B_3 eine gesteigerte Formaldehydbildung gefunden. Auch dies deutet auf eine gewisse Beteiligung der O- bzw. N-Demethylasen nach Induktion hin.

Eine klarere Differenzierung zwischen der N-Methylhydrazin-N-Demethylierung sowie der N-Methylamin- und O-Demethylierung konnte bei Lebermikrosomen des Meerschweinchens gefunden werden. Während hier die N-Methylhydrazindemethylase-Aktivität (B_1) erheblich geringer ist, werden bei Subst. B_2 und B_3 im Gegensatz

zu Rattenlebermikrosomen wesentlich höhere N-Demethylierungs-raten gefunden. Für eine solche Steigerung müssen die kern-ständigen Methylgruppen verantwortlich gemacht werden.

Die durch 3-MC-Induktion gesteigerte N-Demethylierung macht sich auch auf die Evipan-Schlafzeit bemerkbar. Sie wird gegen-über unbehandelten Kontrolltieren stark verkürzt. Andererseits führt eine Vorbehandlung der Tiere mit SKF 525-A zu einer star-ken Schlafzeitverlängerung, deren Betrag größer ist als die Summe der nur unter SKF bzw. Subst. B₁ erzielten Narkose. Auf die Schlafzeit von PB-induzierten Ratten übt die Substanz B₁ keinen wesentlichen Einfluß aus. Inwieweit nun die Verlänge-rung der Evipanschlafzeit durch eine Hemmung des Barbiturat-abbaus und/oder durch einen hypnotischen Eigeneffekt bedingt ist, kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden, da das Hydra-zon B₁ allein nach Gabe von toxischen Dosen (600 mg/kg) eben-falls bei einigen Tieren, wenn auch nur kurzfristig, eine Nar-kose erzeugte. Eine metabolische Interferenz ist jedoch anzu-nehmen, wenn man berücksichtigt, daß auch, wie in vitro-Ver-suche mit Mikrosomen gezeigt haben, Demethylierungsreaktionen von Aminopyrin und p-Nitroanisol nach Vorbehandlung der Tiere mit Subst. B₁ inhibiert werden.

Die Hemmung der mischfunktionellen Oxidase-Aktivität ist aller-dings nur nach Gabe von hohen Dosen (400 mg/kg) von Subst. B₁ deutlich ausgeprägt und so schnell reversibel, daß nach mehr-facher Gabe mittlerer Dosen mit Ausnahme der Aminopyrindemethy-lierung keine kummulierenden Effekte festgestellt werden können.

E. Z U S A M M E N F A S S U N G

=====

N-Methyl-N-8-chloräthylhydrazin (Subst. A₁) und sein Benzaldehydhydrazon (Subst. B₁) stellen Vertreter einer neuen Substanzklasse dar, die neben fungistatischen und cytostatischen auch über ungewöhnlich starke immunsuppressive Eigenschaften verfügt.

Wie die vorliegenden Ergebnisse gezeigt haben, vermögen die Substanzen A₁ und B₁ unter chemischen Bedingungen zu alkylieren. Diese Eigenschaft ist jedoch im physiologischen Medium nur sehr schwach ausgeprägt, da außer der relativ geringen Hemmung der Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-Aktivität keine weiteren eindeutigen Hinweise für ein alkylierendes Verhalten gefunden werden konnten. Die alkylierende Tendenz kann aber durch Einfügen von Substituenten, die zu einer Erhöhung der Nukleophilität am N²-Stickstoff führen, erhöht werden.

Während die Hydrazone weder über ein reduktives Verhalten verfügen, noch in der Lage sind, unter physiologischen Bedingungen Formaldehyd abzuspalten, wird das Hydrazin (Subst. A₁) durch 2,6-Dichlorphenolindophenol-Na und Jod oxidiert. Im Gegensatz zu dem Methylhydrazinderivat Procarbazin (Subst. C), das ebenfalls zu reduzieren vermag, spaltet die Subst. A₁ infolge einer solchen Oxidation kein Formaldehyd ab. Dies ist erst bei Gegenwart eines NADPH regenerierenden Systems der Fall.

Im mikrosomalen System werden das Hydrazon B_1 und seine kernsubstituierten Analogen (N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-(3,4-dimethoxybenzaldehyd)-hydrazon = B_2 und N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-(4-dimethylaminobenzaldehyd)-hydrazon = B_3) im Vergleich zum Procarbazin (Subst. C) stärker N-demethyliert. Dieser metabolische Abbau kann wohl durch 3-Methylcholanthren, jedoch nicht durch Phenobarbital induziert werden. Durch Einsatz der mikrosomalen Hemmstoffe, Kohlenmonoxid, SKF 525-A und Metyrapon, wurde wahrscheinlich gemacht, daß zumindest nach Induktion neben der N-Methylhydrazindemethylierung auch Demethylierungsreaktionen an den Kernsubstituenten stattfinden. Weiterhin wurde ein unterschiedliches Abbaumuster durch Ratten- bzw. Meerschweinchenlebermikrosomen aufzeigt.

Das Hydrazon B_1 führt zu einer dosisabhängigen Evipanschlafzeitverlängerung, die neben einem Angriff in den Barbituratstoffwechsel auch durch eine gewisse hypnotische Eigenwirkung bedingt sein kann. Hohe Dosen von Subst. B_1 (400 mg/kg) in vivo führen zu einer Senkung des Gehaltes von Cytochrom P 450 und einer damit verbundenen überproportional starken Reduzierung der Aktivität mischfunktioneller Oxidasen. Diese Hemmung ist reversibel und bei mehrfacher Gabe mittlerer Dosen (200 mg/kg) so gering, daß es im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen bis auf die Aminopyrindemethylierung zu keiner Kumulation kommt. Dies gilt auch für die Eigendemethylierung von Subst. B_1 .

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

=====

1. Anders, M.W.: Enhancement and inhibition of drug metabolism.
Ann. Rev. Pharmacol. 11, 37-56 (1971)
2. Baggiolini, M., Dewald, B. and Aebi, H.: Oxidation of
p-(N¹-methylhydrazino methyl)-N-isopropyl benzamide
(Procabazine) to the methylazo derivative and oxi-
dative cleavage of the N²-C bond in the isolated
perfused rat liver.
Biochem. Pharmacol. 18, 2187-2196 (1969)
3. Beraud, M., Gaillard, D. et Deracke, R.: Effet de L'ingestion
de dérivés de la Quinoxaline sur les activités de dé-
toxication enzymatique des microsomes hépatiques du
rat.
Arch. int. Pharmacodyn. 218, 328-337 (1975)
4. Bereneis, K., Kofler, M. Bollag, W., Kaiser, A., and
Langemann, A.: The degradation of deoxyribonucleic
acid by new tumor inhibiting compounds: the inter-
mediate formation of hydrogen peroxide.
Experientia 19, 3 132-133 (1962)
5. Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse, Band I,
3. Aufl. 1974, S. 495-496, Verlag Chemie Weinheim/
Bergstraße
6. Böhme, H. und Hartke, K.: Formaldehyd-Lösung.
Deutsches Arzneibuch, 7. Ausgabe, Kommentar
S. 815-819 (1968)
7. Böhme, H. und Martin, F.: Über β -Chlor- und β -Mesyl-äthyl-
hydrazine.
Arch. Pharmaz. (Weinheim), 307, 272 (1974)

8. Bollag, W., Grunberg, E.: Tumor inhibitory effects of a new class of cytotoxic agents: methylhydrazine derivatives.
Experientia 19, 130 (1963)
9. Bouhon, D.: Untersuchungen zur Oxydation von Hydrazin und Alkylhydrazinen im biologischen Milieu.
Humanbiol. Diss. Marburg (1973)
10. Braun, R. und Hefter, E.: Zur Struktur-Wirkungs-Beziehung von N'-Methyl-N'- β -chloräthylbenzaldehydhydrazon
Arzneimittelforsch. 1976 im Druck
11. Braun, R., Hefter, E. und Weber, K.: Zur Wirkung von N'-Methyl-N'- β -chloräthyl-benzaldehyd-hydrazonen auf die aerobe Glykolyse der Ehrlich-Ascites-Zelle
Arzneimittelforsch. 1976 im Druck
12. Braun, R. und Lange, H.: Über den biologischen Einfluß von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und seinem Benzaldehydhydrazon auf Hefezellen.
Z. Naturforsch. 31c, 292-297 (1976)
13. Braun, R., Lange, H., Mangold, U. und Mangold, R.:
Zur Wirkung von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und seinem Benzaldehydhydrazon auf die RNA- und Proteinsynthese sowie Stoffwechsel von synchronisierten Hefezellen.
Z. Naturforsch. 31c, 298-303 (1976)
14. Braun, R., Mangold, U. und Mangold, R.:
Zum cytostatischen Wirkmechanismus von N-Methyl-N- β -chloräthylhydrazin und seinem Benzaldehydhydrazon.
Z. Krebsforsch. (1976) im Druck.
15. Braun, R. und Wolf, G.: Zur cytostatischen Wirkung von N-Methyl-N- β -chloräthyl-hydrazin und seinem Benzaldehydhydrazon. Z. Krebsforsch. 86, 127-133 (1976)
16. Brown, C.M. and Hough, J.S.: Protein-disulphide reductase activity in yeast.
Nature 211, 201 (1966)
17. Chapman, N.B. and James, J.W.: N-Ethyl (or Methyl - or - phenyl)-N-2-halogenoethyl-1(or-2)-naphtyl-methylamines.
Part II. Chemical reactivity and pharmacological activity. J. chem. Soc. 2103 (1954)

18. Dewald, B., Baggiolini, M. and Aebi, H.:
N-demethylation of p-(N-methylhydrazino methyl)-
N-isopropyl benzamide (Procarbazine), a cytostati-
cally active methylhydrazine derivate, in the in-
tact rat and in the isolated perfused rat liver.
Biochem. Pharmacol. 18, 2179-2186 (1969)
19. Domagk, G., Offe, H.A., and Siefken, W.:
Beitr. Klin. Tuberkul. 107, 325 (1952)
20. Druey und Ringer, B.H.: Hydrazinderivate der Phthalazin und
Pyridazinreihe.
Helv. chim. Acta 34, 195-210 (1951)
21. Dus, K., Katagiri, M., Yu, C.-A., Erbes, D.L., and Gunsalus, I.C.:
Chemical characterization of cytochrome P 450_{cam}.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 1423-1430 (1970)
22. Dus, K., Litchfield, J., and Miguel, A.G.: Structural resem-
blance of cytochrome P 450 isolated from *Pseudomonas*
putida and from rabbit liver microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 15-21 (1974)
23. Eade, N.R., MacLeod, S.M., and Renton, K.W.: Inhibition of
hepatic microsomal drug metabolism by the hydrazines
RO4-4602, MK 486, and procarbazine hydrochloride.
Can. J. Physiol. Pharmacol. 50, 721-724 (1972)
24. Epstein, J., Rosenthal, R.W., and Ess, R.J.:
Use of 4-(4-Nitrobenzyl)pyridine as analytical
reagent for ethylenimines and alkylating agents.
Anal. Chem. 27, 1435-1439 (1955)
25. Fox, H.H. and Gibas, J.T.: Synthetic tuberculostats V.
Alkylidene derivatives of Isonicotinyl-hydrazine.
J. org. Chemistry 18, 983 (1953)
26. Friedman, O.M. and Boger, E.: Colorimetric estimation of
nitrogen mustards in aqueous media.
Anal. Chem. 33, 906-910 (1961)
27. Gill, E. W. and Rang, H.P.: An alkylating derivative of
benzilylcholine with specific and long-lasting
parasympatholytic activity.
Mol. Pharmacol. 2, 284-297 (1966)
28. Golumbic, C., Fruton, J.S., and Bergmann, M.: Chemical
reactions of the nitrogen mustard gases.
J. org. Chem. 11, 518-535 (1946)

29. Gram, T.E. and Gillette, J.R.: Biotransformation of drugs
Fundamentals of Biochemical Pharmacology.
Pergamon Press.
30. Greim, H.: Synthesesteigerung und Abbauehemmung bei der Vermehrung der mikrosomalen Cytochrome P 450 und b_5 durch Phenobarbital.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. and exp. Path. 266, 261-275 (1970)
31. Greim, H. und Seifert, J.: Die Wirkung von Phenobarbital auf das proteosynthetische System der Rattenleber.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. and exp. Path. 260, 123-124 (1968)
32. Guth, J.A. und Manner, L.: 4-(p-Nitrobenzyl)-pyridin als Reagens zur dünnsschichtchromatographischen Bestimmung verschiedener Azaheterozyklen.
J. Chromatog. 30, 514-521 (1967)
33. Hefter, E.: Humanbiol. Inaugural-Diss. Marburg (in Vorbereitung).
34. Hildebrandt, A. and Estabrook, R.W.: Evidence for the participation of cytochrome b_5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions.
Arch. Biochem. Biophys. 143, 66-79 (1971)
35. Hildebrandt, A.G., Leibman, K.C. and Estabrook, R.W.: Metirapone interaction with hepatic microsomal cytochrome P 450 from rats treated with phenobarbital.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 477-485 (1969).
36. Horning, E.C., Horning, U.H.G.: Methone derivatives of aldehyds. J. org. Chem. 11, 95-99 (1946)
37. Huang, A.T., Guttermann, J. and Hochstein, P.: Cytogenetic changes induced by 1-(N-methylhydrazinomethyl)-N-isopropyl benzamide in Ehrlich ascites tumor cells.
Experientia 25, 2 203-204 (1968)
38. Isler, O., Gutmann, H. Straub, O., Fast, B., Böhm, E. und Struder, A.: Chemotherapie der experimentellen Tuberkulose II. Kernsubstituierte Isonicotinsäurehydrazide.
Helv. chim. Acta 38, 1033-1046 (1955)

39. Jonen, H.G., Hühwohl, B., Kahl, R. and Kahl, G.F.:
Influence of pyridine and some pyridine derivatives
on spectral properties of reduced microsomes and on
microsomal drug metabolizing activity.
Biochem. Pharmacol. 23, 1319-1329 (1974)
40. Kato, R. and Gillette, J.R.:
Effect of starvation on NADPH-dependent enzymes in
liver microsomes of male and female rats.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 150, 279-284 (1965)
41. Kato, R., Takanaka, A., and Shoje, H.:
Inhibition of drug-metabolizing enzymes of liver
microsomes by hydrazine derivatives in relation to
their lipid solubility.
Jap. J. Pharmacol. 19, 315-322 (1969)
42. Koenigs, E., Köhler, K. und Blindow, K.:
Zur Kenntnis der Pyridon-methide.
Ber. dtsh. chem. Ges. 58, 933-940 (1925)
43. Kreis, W., Piepho, S.B., and Bernhard, H.V.:
Studies on the metabolic fate of the ^{14}C -labeled
methyl group of a methylhydrazine derivative in
P 815 mouse leukemia.
Experientia 22, 7, 431-433 (1966)
44. Kreis, W. and Yen, W.: An antineoplastic ^{14}C -labeled
methylhydrazin derivative in P 815 mouse leukemia.
A metabolic study.
Experientia 21, 5, 284-286 (1964)
45. Krueger, C.A. and Cook, D.A.: Synthesis and adrenergic
neuron blocking properties of some alkylating ana-
logues of bretylium.
Arch. int. Pharmacodyn. 218, 96-105 (1957)
46. Langbehn, J.: Der RNS-Stoffwechsel von Hefe (*Saccharomyces
cerevisiae*) unter Wachstums- und Vermehrungsbedin-
gungen.
Med. Diss. Marburg (1972)
47. Lange, H.: Über die Beeinflussung von Wachstum und Vermeh-
rung von Hefezellen (*Sacch. cerevisiae*) durch
 β -chlorierte Methylhydrazine.
Med. Diss. Marburg (1975)
48. La Roche, M.-J. and Brodie, B.B.: Lack of relationship
between inhibition of monoamine oxidase and poten-
tiation of hexobarbital hypnosis.
J. Pharmacol.Exp.Ther. 130, 134-137 (1960)

49. Lee, J.P. and Lucier, G.W.: The potentiation of barbiturate-induced narcosis by Procarbazine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 196, 586-593 (1976)
50. Leibman, K.C.: Effects of metyrapone on liver microsomal drug oxidations.
Mol. Pharmacol. 5, 1-9 (1969)
51. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
52. Mangold, R.: Untersuchungen zur Wirkung von 8-chlorierten Methylhydrazinen auf Ehrlich-Asciteszellcarcinomzellen in vitro.
Med. Diss. Marburg
53. Mangold, U.: Untersuchungen über den Mechanismus der cyto-statischen Wirkung von 8-chlorierten Methylhydrazinen an Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*).
Med. Diss. Marburg (1975)
54. MacFadyen, D.A.: Estimation of formaldehyde in biological mixtures.
J. Biol. Chem. 158, 107-133 (1945)
55. McBride, W.R. und Kruse, H.W.: Formation of a new diazo-like species by the oxidation of 1,1-dialkylhydrazines in solution.
J. Am. Chem. Soc. 79, 572-576 (1957)
56. Miura, K., Reckendorf, H.K.: The nitrofurans, in: G.P. Ellis, G.B. West: Progress in medicinal chemistry, Bd. 5, S. 320.
57. Müller, E.: Zum Mechanismus der Glykolyse-Hemmung durch Hydrazin-Derivate.
Med. Diss. Marburg (1960)
58. Nash, T.: The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction.
Biochem. J. 55, 416-421 (1953)
59. Netter, K.J.: Inhibition of oxidative drug metabolism by metyrapone. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1618 - 1619 (1968)
60. Netter, K.J.: Grundlagen des Arzneimittelstoffwechsels, Arzneimittelforsch. 22, 285-292 (1972)

61. Netter, K. J. und Jenner, S.:
Über die Rolle von Sulfhydrylgruppen bei der mikrosomalen Arzneimitteldemethylierung.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.u.exp. Path. 255, 120-132 (1966)
62. Netter, K. J., Kahl, G.-F., and Magnussen, M. P.:
Kinetic experiments on the binding of metyrapone to liver microsomes.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak.u.exp. Path. 265, 205-215 (1969)
63. Nickerson, W.J. and Falcone, G.:
Identification of protein disulfide reductase as a cellular division enzyme in yeasts.
Science 124, 722-723 (1956)
64. Norpoth, K. Addicks, H.W. und Witting, U.:
Quantitative Bestimmung alkylierender Zytostatika auf der DC-Platte mit 4-Pyridincarboxaldehyd-2-benzothiazolylhydrazon (PBH)
Arzneimittelforsch. 23, 1529-1535 (1973)
65. Norpoth, K., Schriewer, H. und Rauen, H.M.:
Dünnschichtchromatographie alkylierender Verbindungen mit 4-(4-Nitrobenzyl)pyridin (NBP).
Arzneimittelforsch. 21, 1718-1721 (1971)
66. Omura, T. and Sato, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes.
J. Biol. Chem. 239, 2370-2385 (1964)
67. Pletscher, A., Zeller, P. und Gey, K.E.: Monoaminoxidase-Hemmer. Fortschritte der Arzneimittelforschung 2, 417 (1960)
68. Preussmann, R., Hengy, H., Lübke, D. und v. Hodenberg, A.:
Photometrische Bestimmung aliphatischer Azo- und Hydrazo-Verbindungen.
Anal. Chim. Acta 41, 497-504 (1968)
69. Preussmann, R., Hengy, H. und v. Hodenberg, A.:
Eine neue photometrische Bestimmungsmethode von 1,1-Dialkylhydrazinen.
Anal. Chim. Acta 42, 95-99 (1968)
70. Preussmann, R., Satzinger, C. und Schmähel, D.:
N,N-Bis-(8-chloräthyl)-hydrazin und seine cancerotoxische Wirksamkeit.
Angew. Chemie 70, 743 (1958)

71. Preussmann, R., Schneider, H. und Eppler, F.:
Untersuchungen zum Nachweis alkylierender Agentien.
Arzneimittelforsch. 19, 1059-1073 (1969)
72. Prough, R. A., Wittkop, J.A., and Reed, D. J.:
Evidence for the hepatic metabolism of some
monoalkylhydrazines.
Arch. Biochem. Biophys. 131, 369-373 (1969)
73. Prough, R. A., Wittkop, J.A., and Reed, D. J.:
Further evidence on the nature of microsomal
metabolism of Procarbazine and related alkyl-
hydrazines. Arch. Biochem. Biophys. 140,
450-458 (1970)
74. Remmer, H., Schenkman, J. und Estabrook, R.W.:
Reaktion von Arzneimitteln mit mikrosomalen
Cytochromen.
Arch. Pharmacol. Exp. Path. 255, 62-63 (1966)
75. Remmer, H., Schenkman, J., and Estabrook, R.W.:
Drug interaction with hepatic microsomal
cytochrome.
Mol. Pharmacol. 2, 187-190 (1966)
76. Sawicki, E., Bender, D.F., Hauser, F.R., Wilson, R.M.; and
Meeker, J.E.: Five new methods for the spectro-
photometric determination of alkylating agents
including some extremely sensitive autocatalytic
methods.
Anal. Chem. 35, 1479-1486 (1963)
77. Sawicki, E., Hauser, T.R., Stanley, T.W., and Elbert, W.:
The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test.
Anal. Chem. 33, 93-96 (1961)
78. Sawicki, E. and Sawicki, C.R.: Analysis of alkylating agents:
applications to air pollution.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 895-920 (1969)
79. Schenkman, J.B., Remmer, H., and Estabrook, R.W.:
Spectral studies of drug interaction with hepatic
microsomal cytochrome.
Mol. Pharmacol. 3, 113-123 (1967)

80. Schenkman, J.B., Wilson, B.J. and Cinti, D.L.:
Diethylaminoethyl 2,2-diphenylvalerate HCl (SKF 525-A) - In vivo and in vitro effects of metabolism by rat liver microsomes-Formation of an oxygenated complex.
Biochem. Pharmacol. 21, 2373-2383 (1972)
81. Schmucker, E.A., Arrhenius, E., and Hultin, T.:
Alterations in microsomal electron transport, oxidative N-demethylation on azo-dye cleavage in carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine-induced liver injury.
Biochem. J. 103, 55-64 (1967)
82. Schulte-Hermann, R.: Induction of liver growth by xenobiotic compounds and other stimuli.
Critical Reviews in Toxicology 3, 97-158 (1974)
83. Siebold, K.: Über die Beeinflussung der Permeation von Methylenblau durch Kationen an Hefezellen.
Med. Diss. Marburg (1961)
84. Smith, P.A.S.: In Open-chain nitrogen compounds,
Vol.2, p.135, Benjamin, New York (1966)
85. Uehleke, H.: Stoffwechsel von Arzneimitteln als Ursache von Wirkungen, Nebenwirkungen und Toxizität.
Fortschritte der Arzneimittelforschung 15, 147-203 (1971)
86. Weitzel, G., Schneider, F., Fretzdorff, A.-M., Durst, J. und Hirschmann, D.: Untersuchungen zum cytostatischen Wirkmechanismus der Methylhydrazine. II. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 433-442 (1966)
87. Weitzel, G., Schneider, F., Fretzdorff, A.-M.:
Cytostatischer Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine. Experientia 20, 38-39 (1963)
88. Weitzel, G., Schneider, F., Fretzdorff, A.-M., Seynsche, K. und Finger, H.: Untersuchungen zum cytostatischen Wirkmechanismus der Methylhydrazine. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 336, 271-282 (1964)
89. Weitzel, G., Schneider, F., Hirschmann, W.-D., Durst, J., Thauer, R., Ochs, H. und Kummer, D.:
Untersuchungen zum cytostatischen Wirkmechanismus der Methylhydrazine. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 443-454 (1967)

90. Williamson, D.H. and Scopes, A.W.:

The behavior of nucleic acids in synchronously
dividing cultures of *saccharomyces cerevisiae*.
Exp. Cell Res. 20, 238 (1960)

91. Wittkop, J.A., Prough, R.A. and Reed, D.J.:

Oxidative demethylation of N-Methylhydrazines by
rat liver microsomes.
Arch. Biochem. Biophys. 134, 308-315 (1969)

92. Yoshida, Y. and Kumaoka, H.:

Studies on the substrate-induced spectral change
of cytochrome P 450 in liver microsomes.
J. Biochem. (Tokyo) 78, 455-468 (1975)

93. Zeller, P., Gutmann, H., Hegedus, B., Kaiser, A.,
Langemann, A., Müller, M.:

Methylhydrazine derivatives a new class of
cytotoxic agents.
Experientia 19, 129 (1963)

Am Schluß dieser Arbeit möchte ich Herrn Doz. Dr. rer. nat.
R. Braun für die freundliche Überlassung des Themas, die stets
hilfreiche Unterstützung und die Übernahme des Correferates
recht herzlich danken.

Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. med. K. J. Netter, Direktor
des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität
Marburg, Lahnberge, für die Übernahme des Referates.

L e b e n s l a u f

- 28.6.1948 Geboren in Grevenbrück (Kreis Olpe) als Sohn des Kaufmanns Gottfried Weber und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Gertheinerich.
- 1954 Einschulung in die Josef-Görres-Schule in Dortmund.
- 1959 Städtisches Gymnasium Attendorn
- 1962 Altsprachliches Staatliches Gymnasium in Dortmund
- 3.7.1967 Abitur am altsprachlich Staatlichen Gymnasium
- 15.9.1967 Apotheker-Praktikant in der Zehnthof-Apotheke in
bis
15.9.1969 Dortmund-Körne
- 2.9.1969 Pharmazeutisches Vorexamen in Arnsberg
- WS 1969/70 Beginn des Pharmaziestudiums an der Philipps-Universität Marburg
- 1.12.1972 Approbation als Apotheker
- 26.1.1973 Heirat mit der Lehrerin Gisela Körber
- 5.2.1975 Wehrdienst als Stabsapotheker in München, Hamm und
bis
30.4.1974 Lippstadt
- Seit
April 1974 Arbeit an der vorliegenden Dissertation.

Meine akademischen Lehrer waren:

Amon, Böhme, Braun, Bürger, Castenholz, Dimroth, Ebel, Eger,
Enders, Haberich, Hartke, Hensel, Heubel, Hilp, Höhl, Ihm,
Kating, Kohlhage, Koransky, v. Kraft, Krieglstein, Kunz, List,
Mannesmann, Mannheim, Matthiessen, Nöth, Nultsch, Otto, Petry,
Pollmann, Portig, Quast, Radsack, Rohen, Sauer, Schiff, Schmid,
Schmitz, Seitz, Siegert, Siess, Slenczka, Steffen, Stuke,
Tücke, Vogel, Walcher, Willuhn.

